

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

Progetto PRIN NO PANIC: sviluppo e validazione di una metodica LC-MS/MS per la determinazione di oppiacei su DBS

Relatore:
Prof. Luca Morini

Correlatore:
Valentina Martini

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di
Michela Petti
Matr. 502985

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1. Introduzione 1

1.1 Progetto PRIN NO PANIC 1

2. Molecole oggetto di studio 2

2.1. Morfina 2

2.1.1 Struttura chimica 2

2.1.2 Farmacodinamica 3

2.1.3 Farmacocinetica 4

2.1.4 Impiego clinico e abuso della morfina 7

2.2 6-Acetilmorfina 8

2.2.1 Struttura chimica 8

2.2.2 Farmacodinamica 9

2.2.3 Farmacocinetica 10

2.3 Codeina 12

2.3.1 Struttura chimica 13

2.3.2 Farmacodinamica 14

2.3.3 Farmacocinetica 15

2.3.4 Impiego clinico e abuso della codeina 17

2.4 Diidrocodeina 18

2.4.1 Struttura chimica 18

2.4.2 Farmacodinamica 19

2.4.3 Farmacocinetica 20

3. Matrice ematica 22

3.1 Composizione e caratteristiche del sangue intero 22

3.2 Distribuzione degli xenobiotici nel sangue e rilevanza tossicologica 22

3.3 Prelievo e gestione dei campioni ematici in ambito tossicologico-forense 24

3.4 Dried Blood Spots (DBS) 25

4. LC-MS/MS 27

4.1 Cromatografia liquida 27

4.2 Fase mobile 28

4.3 Fase stazionaria 29

4.4 Componenti di un sistema LC 30

4.5 Spettrometria di massa 32

5. Scopo della Tesi.....35

6. Materiali e metodi.....36

6.1 Sostanze pure e reagenti..... 36
6.2 Vetreria, materiali da laboratorio e strumenti 37
6.3 Campioni biologici 38
6.3.1 Preparazione del campione 38
6.3.1.1 Allestimento campione di sangue 38
6.3.1.2 Allestimento DBS 39
6.3.2 Purificazione mediante SPE..... 39
6.3.3 Caratterizzazione delle sostanze in MS/MS 39
6.3.4 Sviluppo del metodo cromatografico 41
6.3.5 Ottimizzazione dei parametri di ionizzazione in LC-ESI-MS/MS..... 42
6.4 Rette di calibrazione 43
7. Sviluppo dei metodi 44

7.1 Studio di selettività..... 44
7.2 Sensibilità analitica 45
7.3 Linearità e variabilità del dato 45
7.4 Accuratezza e Precisione 46
7.5 Effetto matrice e Recupero 46
7.6 Effetto di trascinamento 48
7.7 Stabilità 48
8. Risultati e discussione.....48

8.1 Sviluppo e validazione metodo LC-MS/MS..... 48
8.1.1 Sensibilità analitica 49
8.1.2 Linearità, Accuratezza e Precisione 51
8.1.3 Riproducibilità 53
8.1.4 Effetto Matrice e Recupero 55
8.1.5 Effetto trascinamento 61
9. Conclusioni.....64

Bibliografia.....65

INDICE FIGURE

Figura 1: Struttura della Morfina 2
Figura 2: Metabolismo della Morfina (8) 6
Figura 3: Struttura della 6-Acetilmorfina 9
Figura 4: Metabolismo dell'eroina e suoi derivati. Adattato da (24) 11
Figura 5: Struttura della Codeina 14
Figura 6: Metabolismo della codeina (42) 16
Figura 7: Struttura della Diidrocodeina 19
Figura 8: Metabolismo della diidrocodeina (57) 21
Figura 9: Schema a blocchi di HPLC (84) 32
Figura 10: Rappresentazione grafica del gradiente. Fase A blu e Fase B rosso 42
Figura 11: Cromatogrammi rappresentanti i picchi cromatografici relativi alle sostanze in esame e allo standard interno di campioni di sangue intero 50
Figura 12:Cromatogrammi rappresentanti i picchi cromatografici relativi alle sostanze in esame e allo standard interno di campioni DBS 51
Figura 13: Retta di calibrazione a 7 punti per la Morfina nel sangue intero 52
Figura 14: Retta di calibrazione a 7 punti per la 6-Acetilmorfina nel sangue intero 52
Figura 15: Retta di calibrazione a 7 punti per la Codeina nel sangue intero 52
Figura 16: Retta di calibrazione a 7 punti per la Diidrocodeina nel sangue intero 52
Figura 17: Retta di calibrazione a 7 punti per la Morfina in DBS 53
Figura 18: Retta di calibrazione a 7 punti per la 6-Acetilmorfina in DBS 53
Figura 19: Retta di calibrazione a 7 punti per la Codeina in DBS 53
Figura 20: Retta di calibrazione a 7 punti per la Diidrocodeina in DBS 53
Figura 21: Cromatogrammi relativi all'effetto matrice a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni di sangue 57
Figura 22: Cromatogrammi relativi all'effetto matrice a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni DBS 58
Figura 23: Cromatogrammi relativi al recupero a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni di sangue intero 60
Figura 24: Cromatogrammi relativi al recupero a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni DBS 61

Figura 25: Campioni "bianchi" di sangue intero analizzati dopo il punto più alto della retta (1000 ng/mL)..... 62
Figura 26: Campioni "bianchi" DBS analizzati dopo il punto più alto della retta (1000 ng/mL) 63

INDICE TABELLE

Tabella 1: Parametri di ionizzazione e transizioni ioniche degli analiti. 41
Tabella 2: Parametri di eluizione cromatografica 42
Tabella 3: Parametri di ionizzazione ESI..... 43
Tabella 4: Valori di LOD e LOQ calcolati per ciascuna molecola analizzata in LC MS/MS 49
Tabella 5: Valori di LOD e LOQ calcolati per ciascuna molecola analizzata in LC MS/MS 49
Tabella 6: Accuratezza e Precisione del metodo per tutte le sostanze nei campioni di sangue intero..... 54
Tabella 7: Accuratezza e Precisione del metodo per tutte le sostanze nei campioni DBS 55
Tabella 8: Effetto matrice dei campioni di sangue intero 56
Tabella 9: Effetto matrice dei campion i DBS..... 56
Tabella 10: Recupero relativo ai campioni di sangue intero..... 59
Tabella 11: Recupero relativo ai campioni DBS..... 59

1. Introduzione

1.1 Progetto PRIN NO PANIC

Il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito del progetto di ricerca PRIN-NO PANIC (New and Old Psychoactive drugs Abuse and Neuroenhancers use Investigation among Current University Students), uno studio osservazionale multicentrico, senza finalità di lucro, finalizzato a indagare l'utilizzo di sostanze psicoattive tra gli studenti iscritti ai corsi di laurea in Medicina e Chirurgia delle Università degli Studi di Pavia e Bologna.

Lo studio viene condotto durante il periodo della sessione d'esami, con l'obiettivo di valutare se l'aumento della percezione dello stress possa essere associato a un incremento dell'utilizzo di sostanze stupefacenti. A tale scopo, il progetto prevede la compilazione di un questionario volto a valutare lo stato psicologico degli studenti, con particolare attenzione ai livelli di stress percepito e all'eventuale consumo di sostanze psicoattive.

Successivamente, i partecipanti vengono sottoposti al prelievo di campioni di matrice cheratinica e di sangue mediante Dried Blood Spots (DBS), destinati alla successiva analisi strumentale per la ricerca delle sostanze di interesse. L'integrazione dei dati ottenuti mediante i questionari con i risultati delle analisi condotte sui campioni biologici consente di valutare l'eventuale presenza di una relazione tra i livelli di stress e il consumo di sostanze psicoattive.

2. Molecole oggetto di studio

2.1. Morfina

La morfina è l'oppiaceo più abbondante contenuto all'interno del *Papaver somniferum*, comunemente noto come papavero da oppio. Fu isolata per la prima volta all'inizio del XIX secolo dal farmacista tedesco Friedrich Wilhelm Adam Sertürner, che riuscì a ottenere il principio attivo in forma cristallina, dimostrandone le proprietà farmacologiche attraverso studi sperimentali (1) (2).

La morfina è un farmaco analgesico oppioide indicato nel trattamento del dolore acuto e cronico di intensità moderata-severa. La sua azione farmacologica si esplica principalmente a livello del sistema nervoso centrale, attraverso l'attivazione dei recettori oppioidi, con particolare affinità per i recettori μ (mu), responsabili dei suoi effetti analgesici. Nonostante la sua elevata efficacia terapeutica, l'impiego della morfina è associato a un significativo rischio di abuso e dipendenza. L'uso prolungato può infatti determinare lo sviluppo di tolleranza farmacologica, dipendenza fisica e dipendenza psicologica, limitandone l'impiego e richiedendo un attento monitoraggio clinico (3,4).

2.1.1 Struttura chimica

La morfina ($C_{17}H_{19}NO_3$) è un alcaloide naturale caratterizzato da una struttura fenantrenica. La sua attività farmacologica è strettamente correlata a specifiche caratteristiche strutturali, che costituiscono i principali elementi farmacoforici coinvolti nell'interazione con i recettori oppioidi. Tra queste rientrano un gruppo amminico terziario debolmente basico, protonato a pH fisiologico e localizzato in posizione 17, un anello aromatico separato dall'atomo di azoto da una distanza ottimale di due o tre atomi di carbonio e un gruppo ossidrilico fenolico in posizione 3 coinvolto nella formazione di legami a idrogeno con il recettore μ-oppioide (1).

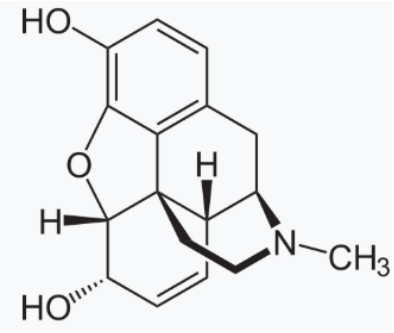


***Figura 1**: Struttura della Morfina*

2.1.2 Farmacodinamica

I recettori oppioidi classici comprendono tre principali sottotipi: μ (MOR), κ (KOR) e δ (DOR). La morfina agisce prevalentemente come agonista dei recettori μ (MOR), per i quali presenta la maggiore affinità, mentre l'interazione con i recettori κ (KOR) e δ (DOR) è di minore rilevanza farmacologica a causa della ridotta affinità della molecola per tali sottotipi recettoriali. I recettori oppioidi sono espressi nel sistema nervoso centrale, nel midollo spinale e nel plesso enterico dell'intestino. L'attivazione dei recettori μ media la maggior parte degli effetti farmacologici della morfina: a livello del SNC e del midollo spinale induce analgesia, sedazione, euforia e depressione respiratoria, contribuendo inoltre allo sviluppo di tolleranza, di dipendenza e al potenziale di abuso. A livello periferico, in particolare nel tratto gastrointestinale, l'attivazione dei recettori oppioidi determina una riduzione della motilità intestinale, con conseguente comparsa di stipsi (1). Sebbene la morfina interagisca principalmente con i recettori μ, i recettori κ e δ svolgono un ruolo fisiologico nella modulazione della trasmissione nocicettiva. In particolare, l'attivazione dei recettori κ contribuisce all'analgesia, soprattutto a livello spinale, ed è associata a effetti quali disforia, sedazione e diuresi, mentre i recettori δ partecipano alla modulazione del dolore e sono coinvolti nei meccanismi di regolazione dell'umore e nello sviluppo della tolleranza agli oppioidi (5).

I recettori oppioidi appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati a proteina G (GPCR), e sono caratterizzati da una struttura costituita da sette domini transmembrana. In seguito, all' attivazione da parte di ligandi endogeni o di agonisti esogeni, il recettore promuove lo scambio di GDP con GTP sulla subunità α della proteina G, determinando la dissociazione funzionale della subunità G_{α} e $G_{\beta\gamma}$ e l'attivazione delle relative vie di segnalazione intracellulari. In particolare, i recettori oppioidi sono accoppiati a proteine G inibitorie di tipo Gi/o; la subunità Gαi inibisce l'attività dell'adenilato ciclasi, determinando una riduzione della produzione di AMP ciclico (cAMP). Parallelamente, le subunità Gβγ modulano l'attività di diversi canali ionici, promuovendo l'apertura dei canali del K^+ e l'inibizione dei canali voltaggio-dipendenti del Ca^{2+}. L'aumento dell'efflusso di potassio determina l'iperpolarizzazione della membrana neuronale, mentre la riduzione dell'ingresso di calcio nelle terminazioni presinaptiche limita il rilascio di neurotrasmettitori eccitatori, quali glutammato e sostanza P. Nel complesso, tali

meccanismi determinano una riduzione dell'eccitabilità neuronale della trasmissione nocicettiva, contribuendo così all'effetto analgesico della morfina (6).

Oltre all'effetto analgesico, l'attivazione dei recettori μ-oppioidi è associata a numerosi effetti farmacologici, sia centrali sia periferici, tra cui sedazione, euforia, depressione respiratoria, miosi, nausea, vomito e stipsi (1,6). La depressione respiratoria rappresenta uno degli effetti avversi più rilevanti dal punto di vista tossicologico, poiché può risultare potenzialmente fatale in caso di sovradosaggio (1). L'esposizione ripetuta alla morfina può inoltre determinare lo sviluppo di tolleranza e dipendenza, fenomeni conseguenti a complessi adattamenti recettoriali e intracellulari che modificano progressivamente la risposta dell'organismo alla sostanza (1,6).

L'esposizione cronica alla morfina determina lo sviluppo della tolleranza farmacologica, definita come la progressiva riduzione della risposta a una determinata dose del farmaco, con conseguente necessità di incrementare il dosaggio per ottenere il medesimo effetto analgesico. Tale fenomeno è attribuito a complessi meccanismi di adattamento cellulare e molecolare. In particolare, la stimolazione prolungata dei recettori μ-oppioidi induce la fosforilazione del recettore da parte delle G protein-coupled receptor kinases (GRK), favorendo il reclutamento della β-arrestina. Questo processo determina la desensibilizzazione del recettore, la riduzione dell'accoppiamento alle proteine Gi/o e, in alcuni casi, l'internalizzazione recettoriale. Parallelamente, si verificano adattamenti delle vie di trasduzione del segnale intracellulare, tra cui una compensatoria riattivazione della produzione di AMP ciclico (cAMP), che contribuisce alla riduzione dell'efficacia farmacologica della morfina e allo sviluppo della dipendenza fisica (7).

2.1.3 Farmacocinetica

Dal punto di vista farmacocinetico, la morfina può essere somministrata attraverso diverse vie, tra cui quella orale, endovenosa, intramuscolare, sottocutanea, rettale ed epidurale. In seguito a somministrazione orale, la morfina viene assorbita quasi completamente dal tratto gastrointestinale; tuttavia, la biodisponibilità orale risulta variabile a causa dell'importante effetto di primo passaggio epatico. L'assorbimento per via orale segue una cinetica di primo ordine con valori di k_a compresi tra 6.7 e 13.6 h^{-1}; mentre la somministrazione intramuscolare e sottocutanea determina un assorbimento ritardato, con valori di k_a (i.m) pari a 1.03 h^{-1} e k_a (s.c) = 4.14 h^{-1}. Una volta assorbita, la

morfina si distribuisce rapidamente nei diversi tessuti dell'organismo, con concentrazioni particolarmente elevate a livello di fegato, reni e polmoni. La molecola è inoltre in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, sebbene in misura inferiore rispetto ad altri oppioidi maggiormente lipofili, raggiungendo il sistema nervoso centrale dove esercita i propri effetti farmacologici. Il legame alle proteine plasmatiche è relativamente basso (circa il 30–35%) e coinvolge principalmente l'albumina sierica e l'α1-glicoproteina acida (1).

Il metabolismo della morfina avviene prevalentemente mediante reazioni di fase II. Dopo somministrazione orale, la morfina è sottoposta ad un esteso metabolismo di primo passaggio e circa il 50-60% della dose viene coniugato dall'enzima uridina difosfato glucuronosiltransferasi 2B7, UGT2B7 a metaboliti glucuronidati, morfina-3-glucuronide (M3G) e morfina-6-glucuronide (M6G). La M3G rappresenta il principale metabolita della morfina ed è sostanzialmente priva di attività analgesica, mentre la M6G, prodotta in quantità minori, mantiene un'elevata affinità per i recettori μ-oppioidi ed è farmacologicamente attiva, contribuendo all'effetto analgesico complessivo della morfina.

Oltre alla glucuronidazione, la morfina può essere metabolizzata attraverso reazioni di solfatazione, catalizzate da enzimi sulfotransferasi, tra cui SULT1A3. Questa via determina la formazione di morfina-3-solfato e morfina-6-solfato, metaboliti che rappresentano vie alternative di coniugazione rispetto alla formazione dei glucuronidi.

In misura minore, la morfina può andare incontro anche a metabolismo di fase I mediante N-demetilazione, mediata dagli enzimi del citocromo P450 CYP3A4 e CYP2C8, con formazione di normorfina, un metabolita il cui contributo all'effetto analgesico complessivo è limitato. La normorfina può essere ulteriormente metabolizzata mediante glucuronidazione, con formazione di normorfina-3-glucuronide e normorfina-6-glucuronide, come illustrato nella Figura 2 (8,9).

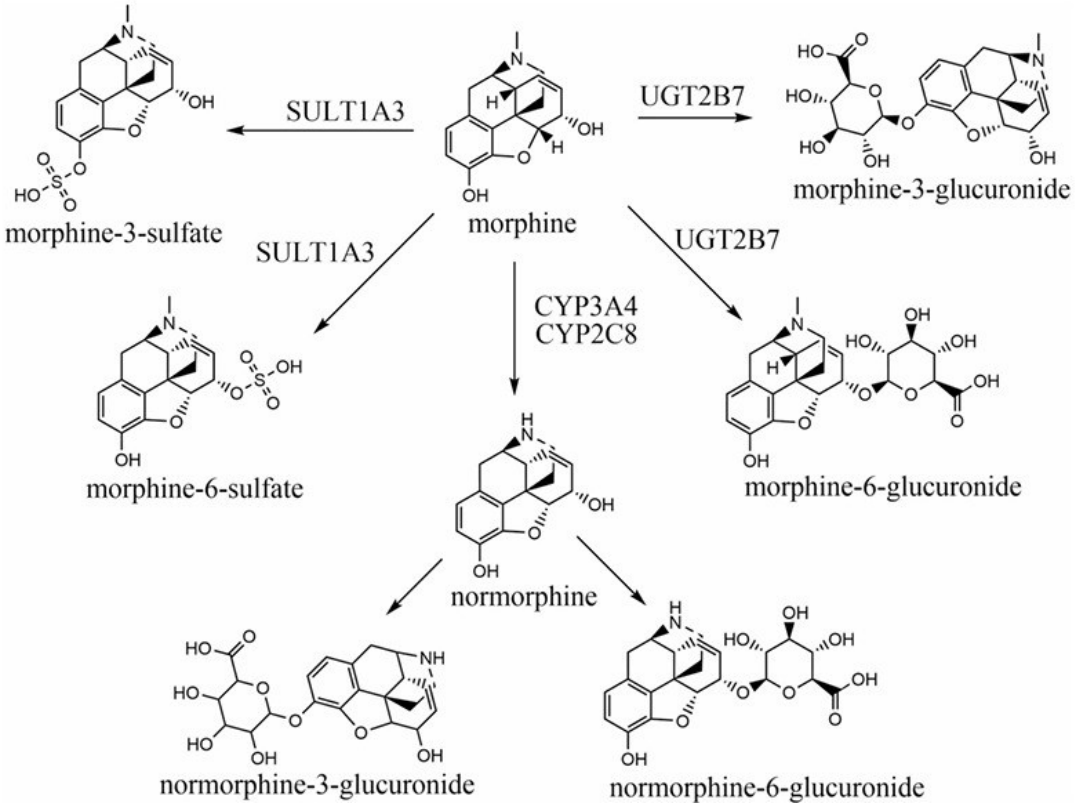


***Figura 2**: Metabolismo della Morfina (8)*

La morfina presenta una farmacocinetica lineare nell'intervallo terapeutico e non determina autoinduzione del proprio metabolismo. L'emivita plasmatica dopo somministrazione orale è relativamente breve, compresa tra circa 2 e 3,5 ore, e le concentrazioni plasmatiche allo stato stazionario vengono raggiunte entro 10–12 ore. L'eliminazione della morfina e dei suoi principali metaboliti avviene prevalentemente per via renale; per questo motivo, in soggetti con funzionalità renale compromessa può verificarsi un accumulo dei metaboliti glucuronidati, in particolare della M6G, con possibile aumento del rischio di effetti tossici (1,10).

In ambito tossicologico-forense, la distribuzione della morfina e dei suoi metaboliti nel sangue e nei diversi sottocompartimenti ematici riveste importanza ai fini della corretta interpretazione dei risultati analitici. La morfina si distribuisce tra la frazione plasmatica e la componete corpuscolata del sangue, mostrando una significativa associazione con la componente eritrocitaria. Al contrario, la distribuzione dei metaboliti glucuronidati, M3G e M6G, può essere maggiormente influenzata da parametri quali l'ematocrito e il contenuto d'acqua del campione. Tali caratteristiche devono essere considerate

nell'interpretazione delle concentrazioni misurate, soprattutto quando si confrontano risultati ottenuti da sangue intero, plasma o altre matrici biologiche (11). Di conseguenza, il rapporto tra le concentrazioni misurate nelle diverse matrici biologiche non è costante e può influenzare la valutazione retrospettiva dell'esposizione alla morfina e l'interpretazione dei risultati tossicologici.

2.1.4 Impiego clinico e abuso della morfina

La morfina rappresenta uno degli analgesici oppioidi maggiormente impiegati nella pratica clinica per il trattamento del dolore acuto e cronico di intensità moderata-severa, in particolare nel dolore oncologico, post-operatorio e nelle cure palliative. Grazie alla sua elevata efficacia analgesica, è considerata il farmaco di riferimento ("gold standard") nella terapia del dolore severo ed è inclusa nell'elenco dei medicinali essenziali dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (12,13). Tuttavia, l'impiego della morfina richiede un attento monitoraggio clinico a causa del rischio di sviluppare tolleranza, dipendenza fisica e psicologica, nonché del potenziale di abuso associato alla sua azione sui recettori μ-oppioidi (14).

L'uso non medico della morfina può avvenire mediante assunzione orale oppure attraverso la manipolazione delle formulazioni farmaceutiche destinate alla somministrazione parenterale, con conseguente incremento del rischio di effetti tossici e di sovradosaggio. L'abuso cronico è associato allo sviluppo di un disturbo da uso di oppioidi (*Opioid Use Disorder*, OUD), caratterizzato da perdita del controllo sull'assunzione, *craving* e persistenza dell'uso nonostante le conseguenze dannose. Nei casi di intossicazione acuta, la depressione respiratoria rappresenta la principale causa di mortalità, rendendo necessario un tempestivo trattamento con antagonisti dei recettori oppioidi, quali il naloxone (15,16).

In tale contesto, la tolleranza agli oppioidi rappresenta un elemento di particolare rilevanza sia dal punto di vista clinico sia in ambito tossicologico-forense. Nei consumatori cronici di morfina, i meccanismi di adattamento recettoriale e cellulare determinano una progressiva riduzione della risposta farmacologica, rendendo necessario un incremento del dosaggio per ottenere il medesimo effetto analgesico. Di conseguenza, soggetti tolleranti possono presentare concentrazioni ematiche di morfina significativamente superiori rispetto ai soggetti naïve senza manifestare gli stessi effetti

tossici. Pertanto, nell'interpretazione tossicologico-forense dei risultati analitici, le concentrazioni di morfina non devono essere considerate isolatamente, ma valutate alla luce della storia clinica e tossicologica del soggetto, poiché non è possibile definire un intervallo di concentrazioni universalmente associato a tossicità o letalità.

2.2 6-Acetilmorfina

La 6-Acetilmorfina, nota anche come 6-monoacetilmorfina, 6-MAM o 6-AM, è il principale metabolita farmacologicamente attivo dell'eroina, nota anche come 3,6-diacetilmorfina o diamorfina (17). In seguito alla somministrazione, l'eroina viene rapidamente deacetilata a 6-acetilmorfina che viene successivamente convertita in morfina (18).

In ambito tossicologico-forense, la 6-acetilmorfina riveste particolare importanza poiché la sua rilevazione nelle matrici biologiche, quali sangue e urina, rappresenta un indicatore specifico di assunzione di eroina. La sua rapida formazione e la successiva trasformazione in morfina ne determinano tuttavia una permanenza relativamente breve nell'organismo, limitandone la finestra di rilevabilità, soprattutto nei campioni post-mortem. Di conseguenza, la mancata identificazione della 6-acetilmorfina non consente di escludere con certezza un precedente consumo di eroina e i risultati analitici devono essere interpretati considerando il tempo intercorso all'assunzione, la matrice biologica analizzata e il contesto clinico e tossicologico del caso (19).

2.2.1 Struttura chimica

La 6-acetilmorfina è un derivato monoacetilato della morfina appartenente alla classe dei composti morfinanici. Dal punto di vista strutturale, presenta formula molecolare $C_{19}H_{21}NO_4$ e differisce dalla morfina per la presenza di un gruppo acetilico in posizione 6, derivante dall'esterificazione del gruppo ossidrilico alcolico della morfina. Il gruppo ossidrilico fenolico in posizione 3 invece, rimane libero. Tale caratteristica distingue la 6-acetilmorfina dall'eroina (3,6-diacetilmorfina), nella quale risultano acetilati entrambi i gruppi ossidrilici della molecola (17).

L'acetilazione del gruppo ossidrilico presente in posizione 6 modifica le proprietà fisico-chimiche della molecola, aumentandone la lipofilia rispetto alla morfina, come indicato dai valori di XLogP3 calcolati, pari a 1,3 per la 6-acetilmorfina e a 0,8 per la morfina (17). Tale differenza è riconducibile alla conversione del gruppo ossidrilico alcolico della

morfina in un gruppo estereo acetato, che riduce il numero di gruppi donatori di legami a idrogeno e aumenta l'affinità relativa della molecola per gli ambienti lipidici. Questa caratteristica può favorire il rapido accesso al sistema nervoso centrale, come evidenziato da studi preclinici nei quali la 6-acetilmorfina ha mostrato una penetrazione cerebrale più rapida rispetto alla morfina (20).

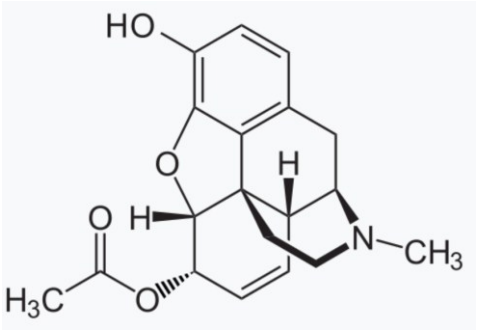


***Figura 3**: Struttura della 6-Acetilmorfina*

2.2.2 Farmacodinamica

La 6-acetilmorfina, analogamente alla morfina, esercita i propri effetti attraverso l'attivazione dei recettori oppioidi, in particolare i recettori μ-oppioidi, appartenenti alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G. L' interazione con tali recettori determina l'attivazione delle medesime vie di trasduzione del segnale precedentemente descritte per la morfina. Studi funzionali hanno mostrato che, nei modelli sperimentali, la 6-MAM presenta un'elevata efficacia nell'attivazione della proteina G mediata dai recettori μ-oppioidi, superiore a quella osservata per la morfina (21).

La rilevanza farmacodinamica della 6-MAM è correlata alla sua rapida formazione a partire dall'eroina e al contributo che essa esercita sugli effetti centrali precoci della sostanza. Studi preclinici hanno evidenziato che la 6-MAM partecipa agli effetti neurali rapidi indotti dall'eroina somministrata per via endovenosa e può contribuire al rilascio acuto di dopamina a livello striatale, un processo coinvolto nei meccanismi di gratificazione e rinforzo associati alle sostanze d'abuso (20,22).

In modelli animali di autosomministrazione, la 6-acetilmorfina ha inoltre dimostrato proprietà rinforzanti, sostenendo il comportamento di autosomministrazione e favorendo la ricaduta (*reinstatement*) nella ricerca della sostanza dopo un periodo di astinenza. Tali

evidenze indicano che la 6-acetilmorfina non rappresenta esclusivamente un metabolita dell'eroina, ma costituisce una molecola farmacologicamente attiva coinvolta nel potenziale d'abuso dell'eroina (23).

2.2.3 Farmacocinetica

Dal punto di vista farmacocinetico, la 6-acetilmorfina rappresenta il primo metabolita farmacologicamente attivo dell'eroina. In seguito alla somministrazione, l'eroina viene rapidamente idrolizzata ad opera delle esterasi plasmatiche e tissutali. La prima reazione consiste nella deacetilazione del gruppo acetilico in posizione 3, con conseguente formazione della 6-acetilmorfina. Successivamente, la rimozione del gruppo acetile residuo in posizione 6 determina la formazione della morfina. Quest'ultima viene metabolizzata prevalentemente mediante glucuronidazione con formazione principale di morfina-3-glucuronide e morfina-6-glucuronide (24).

L'idrolisi dell'eroina e della 6-acetilmorfina è catalizzata da differenti esterasi, ampiamente distribuite nel sangue e nei tessuti, tra cui colinesterasi e carbossilesterasi. Alla rapida trasformazione dell'eroina può contribuire anche una componente di idrolisi spontanea nei fluidi biologici. Sebbene il fegato e i reni partecipino al metabolismo complessivo e all'eliminazione dell'eroina e dei suoi metaboliti, la rapida scomparsa dell'eroina dal circolo ematico è attribuibile principalmente all'elevata attività delle esterasi, all'idrolisi spontanea e alla sua estesa distribuzione nei tessuti (24).

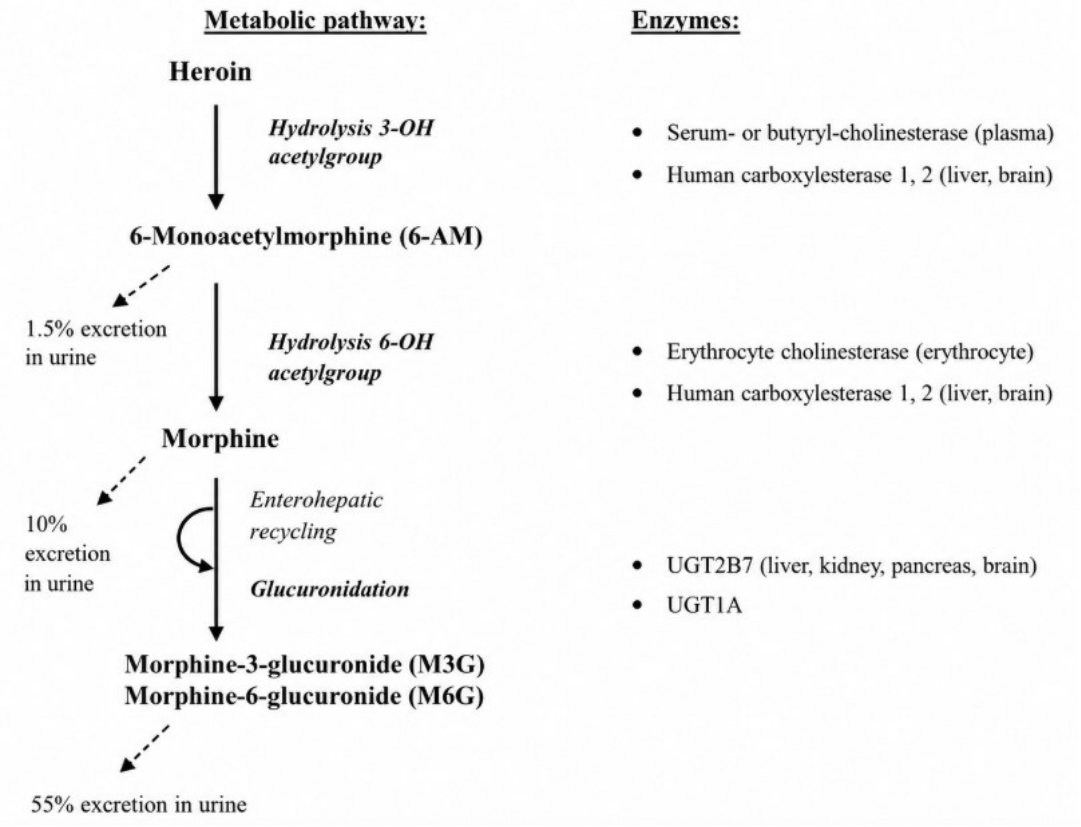


Figura 4: *Metabolismo dell'eroina e suoi derivati. Adattato da (24)*

La via di somministrazione dell'eroina influenza la velocità con cui la sostanza raggiunge la circolazione sistemica e, di conseguenza, il profilo plasmatico della 6-acetilmorfina (25). L'eroina può essere somministrata attraverso diverse vie, tra cui quella orale, endovenosa, intramuscolare, intranasale e per inalazione dei vapori prodotti dal suo riscaldamento (24).

In seguito alla somministrazione per via endovenosa, l'eroina raggiunge immediatamente la circolazione sistemica, viene rapidamente distribuita ai tessuti e metabolizzata a 6-acetilmorfina. Di conseguenza, le concentrazioni plasmatiche della 6-acetilmorfina, aumentano rapidamente, raggiungendo il picco in pochi minuti, per poi diminuire altrettanto rapidamente a causa della successiva conversione in morfina. Anche in seguito all'inalazione dei vapori prodotti dal riscaldamento dell'eroina, l'assorbimento è rapido; tuttavia, le concentrazioni plasmatiche massime di eroina e 6-acetilmorfina risultano da due a quattro volte inferiori rispetto a quelle osservate dopo somministrazione per via endovenosa (25).

In uno studio condotto su soggetti dipendenti da eroina, la biodisponibilità dell'eroina inalata è stata stimata pari al 53%. Nel modello sviluppato per confrontare la somministrazione endovenosa e quella inalatoria, l'emivita terminale è risultata pari a 7,6 minuti per l'eroina e a 21,8 minuti per la 6-acetilmorfina. Nelle condizioni sperimentali dello studio, l'eroina risultava generalmente non più rilevabile nel plasma dopo 10–40 minuti dalla somministrazione, mentre la 6-acetilmorfina poteva essere rilevata fino a circa 2–3 ore dalla somministrazione (25).

Un andamento analogo è stato osservato anche in seguito alla somministrazione intranasale e intramuscolare di eroina: in entrambe le condizioni, le concentrazioni sieriche di eroina e 6-acetilmorfina aumentavano rapidamente ed erano seguite da una rapida fase di diminuzione, mentre la morfina e i suoi metaboliti glucuronati presentavano un andamento più lento e prolungato. A parità di dose, l'esposizione sistemica all'eroina risultava inferiore dopo somministrazione intranasale rispetto alla via intramuscolare, evidenziando come la via di assunzione influenzi significativamente l'entità dell'assorbimento e la quantità di sostanza che raggiunge la circolazione sistemica (26).

2.3 Codeina

La codeina, anche denominata 3-O-metilmorfina, è un alcaloide morfinanico naturale presente nell'oppio ottenuto da *Papaver somniferum*. Fu isolata per la prima volta nel 1832 dal farmacista e chimico francese Pierre-Jean Robiquet, nell'ambito degli studi rivolti all'isolamento e alla caratterizzazione dei principali costituenti dell'oppio (27,28).

La codeina è un analgesico oppioide impiegato principalmente nel trattamento del dolore di intensità da lieve a moderata. Presenta anche effetti sulla motilità gastrointestinale, riducendo la peristalsi intestinale e conferendo alla molecola proprietà antidiarroiche (27). È inoltre utilizzata come antitussivo, generalmente in formulazioni liquide e in associazione con altri principi attivi.

In ambito farmaceutico, la codeina è frequentemente impiegata sotto forma di codeina fosfato, caratterizzata da una maggiore solubilità in acqua rispetto alla base libera. Nelle formulazioni analgesiche è spesso associata a paracetamolo, ibuprofene o acido acetilsalicilico, al fine di ottenere un effetto analgesico additivo o sinergico e consentire l'impiego di dosi inferiori di ciascun principio attivo (29,30).

La codeina è comunemente considerata un profarmaco della morfina, poiché possiede una debole affinità intrinseca per il recettore μ-oppioide e la sua attività analgesica dipende in larga misura dalla conversione metabolica in morfina, catalizzata dall'enzima CYP2D6. La morfina così formata presenta un'affinità per il recettore μ circa 200 volte superiore rispetto alla codeina e contribuisce in maniera sostanziale all'effetto analgesico complessivo (31).

2.3.1 Struttura chimica

La codeina, con formula molecolare $C_{18}H_{21}NO_3$, si presenta come un solido cristallino da incolore a bianco oppure come una polvere bianca, inodore e caratterizzata da un sapore amaro (27).

Dal punto di vista strutturale, la codeina appartiene alla classe dei derivati 4,5-epossimorfinani e possiede il caratteristico scheletro pentaciclico comune agli alcaloidi morfinanici. La sua struttura comprende un anello aromatico, un ponte etereo 4,5-epossidico, un gruppo metossilico in posizione 3, un gruppo ossidrilico alcolico in posizione 6, un doppio legame tra gli atomi di carbonio 7 e 8 e una funzione amminica terziaria N-metilata in posizione 17 (27,32).

La presenza della funzione amminica terziaria conferisce alla codeina un carattere debolmente basico, con un valore di pKa di circa 8,2; di conseguenza, a pH fisiologico è presente prevalentemente in forma protonata. La codeina mostra inoltre una lipofilia lievemente superiore rispetto alla morfina, attribuibile soprattutto alla metilazione del gruppo ossidrilico fenolico in posizione 3 (33).

La codeina differisce dalla morfina principalmente per la metilazione del gruppo ossidrilico fenolico in posizione 3, sostituito nella codeina da un gruppo metossilico; per tale ragione è anche denominata 3-O-metilmorfina. La metilazione impedisce la formazione del legame a idrogeno caratteristico del gruppo fenolico 3-OH della morfina con il sito di legame del recettore μ-oppioide, determinando una minore affinità e una minore attività agonista diretta della codeina. La sua attività analgesica dipende pertanto in larga misura dalla O-demetilazione metabolica a morfina, dotata di maggiore affinità per il recettore μ-oppioide (31,32).

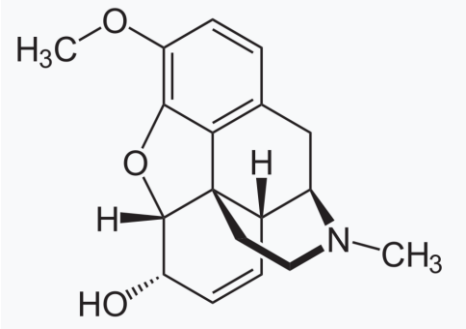


Figura 5: *Struttura della Codeina*

2.3.2 Farmacodinamica

La codeina esercita i propri effetti farmacologici principalmente attraverso l'interazione con il recettore μ-oppioide. Studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che la molecola possiede una debole attività agonista diretta e può comportarsi come un agonista parziale del recettore μ, determinando l'attivazione delle proteine Gi. La sua potenza e la sua efficacia risultano, tuttavia, inferiori rispetto a quelle della morfina (34,35).

L'attivazione del recettore μ avvia la medesima cascata di segnalazione intracellulare descritta per la morfina, determinando una riduzione dell'eccitabilità neuronale e del rilascio di neurotrasmettitori coinvolti nella trasmissione nocicettiva.

Sebbene la codeina presenti una propria attività agonista, il suo effetto analgesico dipende in larga misura dalla conversione metabolica in morfina mediante O-demetilazione catalizzata dall'enzima CYP2D6. La morfina così formata possiede una maggiore affinità e attività agonista nei confronti del recettore μ-oppioide, contribuendo in maniera sostanziale all'effetto analgesico complessivo. Studi condotti mediante inibizione del CYP2D6 o confrontando soggetti con diversa capacità metabolica hanno infatti evidenziato una riduzione dell'efficacia analgesica quando la formazione di morfina risulta limitata (36,37).

Gli effetti farmacologici e avversi della codeina comprendono analgesia, sedazione, miosi, nausea, vomito, depressione respiratoria e riduzione della motilità gastrointestinale. Quest'ultimo effetto è stato osservato anche nei metabolizzatori lenti del CYP2D6, suggerendo che alcune azioni periferiche della codeina non dipendano esclusivamente dalla formazione di morfina (31,38).

2.3.3 Farmacocinetica

Dal punto di vista farmacocinetico, la codeina viene somministrata prevalentemente per via orale, sotto forma di compresse, capsule o soluzioni liquide. Nell'impiego come antitussivo, è frequentemente formulata come soluzione orale o sciroppo, anche in associazione con altri principi attivi (31).

Dopo somministrazione orale, la codeina viene rapidamente ed estesamente assorbita a livello gastrointestinale. Grazie alla sua elevata solubilità e permeabilità, oltre il 90% della dose somministrata viene assorbito e le concentrazioni plasmatiche massime vengono generalmente raggiunte entro circa un'ora dalla somministrazione (39,40).

Dopo l'assorbimento, la codeina si distribuisce ampiamente nei tessuti, presentando un volume apparente di distribuzione di circa 5,1 L/kg. Il legame della molecola alle proteine plasmatiche è moderato ed è stato stimato intorno al 56% (39,41).

La codeina viene metabolizzata principalmente a livello epatico attraverso tre vie metaboliche: glucuronidazione, O-demetilazione e N-demetilazione. La via quantitativamente predominante è rappresentata dalla glucuronidazione diretta della molecola, con formazione di codeina-6-glucuronide; il suo contributo all'analgesia nell'uomo non è tuttavia definito con certezza. Una quota minore della codeina viene sottoposta a O-demetilazione, catalizzata dall'enzima CYP2D6, con formazione di morfina. Sebbene questa via interessi generalmente soltanto una percentuale limitata della dose somministrata, essa riveste particolare importanza farmacologica, poiché la morfina presenta un'attività agonista sul recettore μ-oppioide notevolmente superiore rispetto alla codeina. La morfina viene successivamente sottoposta a glucuronidazione con formazione di morfina-3-glucuronide e morfina-6-glucuronide. Un'ulteriore quota della codeina viene N-demetilata dal CYP3A4 a norcodeina, che può essere successivamente coniugata con acido glucuronico o trasformata in normorfina (42,43).

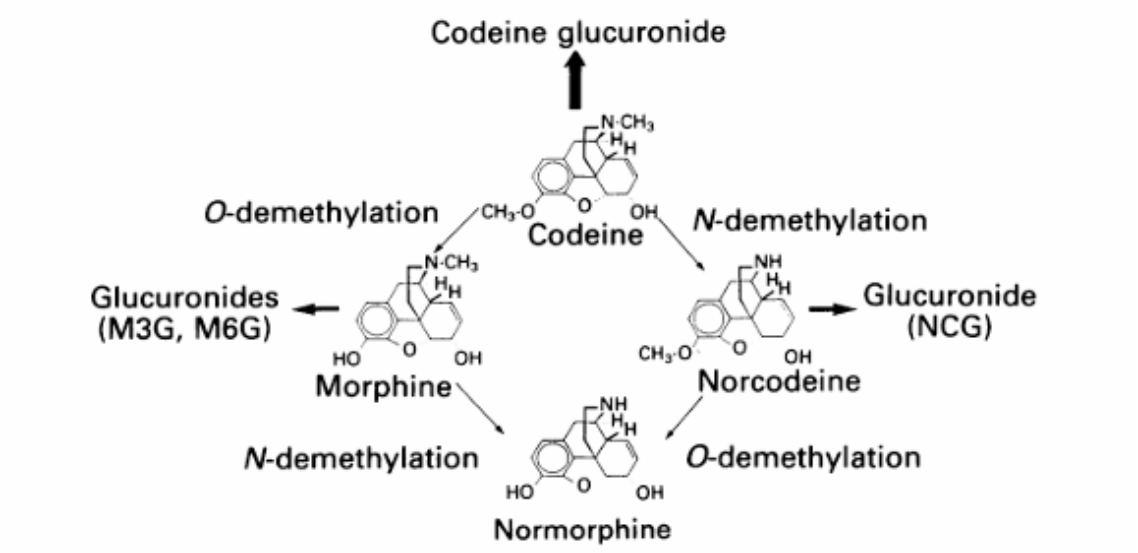


***Figura 6**: Metabolismo della codeina (42)*

La quota di codeina convertita in morfina varia in relazione al fenotipo CYP2D6. Nei metabolizzatori lenti (*poor metabolizers*, PM) la formazione di morfina è ridotta o pressoché assente e, di conseguenza, l'efficacia analgesica può risultare insufficiente. Al contrario, nei metabolizzatori ultrarapidi (*ultrarapid metabolizers*, UM), la maggiore produzione di morfina può determinare una marcata sedazione e aumentare il rischio di depressione respiratoria anche alle dosi terapeutiche (31,44).

La codeina e i suoi metaboliti vengono eliminati prevalentemente per via renale. L'emivita plasmatica della codeina è relativamente breve e varia tra i diversi studi: Yue et al. hanno riportato un valore medio di circa 2,6 ore, mentre Vree e Verwey-van Wissen hanno osservato un'emivita di circa 1,5 ore. Nel complesso, la durata dell'emivita viene generalmente collocata nell'ordine di 2-3 ore, con possibili variazioni legate alla dose, alla formulazione e alle caratteristiche individuali (41,42).

In ambito tossicologico-forense, la contemporanea rilevazione di codeina e morfina richiede particolare cautela nell'interpretazione dei risultati analitici, poiché la morfina può derivare dalla biotrasformazione della codeina, mentre piccole quantità di codeina possono essere riscontrate anche in seguito all'assunzione di eroina illecita. Il rapporto tra le concentrazioni di morfina e codeina può fornire informazioni a supporto dell'interpretazione tossicologica; tuttavia, esso è influenzato dal tempo intercorso dall'assunzione, dal fenotipo metabolico, dalla matrice analizzata e dalle modificazioni post-mortem. Pertanto, tale rapporto deve essere sempre valutato insieme alla presenza di

marcatori specifici, in particolare la 6-acetilmorfina, e al contesto clinico e tossicologico del caso (45,46).

2.3.4 Impiego clinico e abuso della codeina

In ambito clinico, la codeina è impiegata principalmente come analgesico oppioide per il trattamento del dolore di intensità lieve o moderata. Nelle formulazioni analgesiche è frequentemente associata a principi attivi non oppioidi, quali paracetamolo, ibuprofene o acido acetilsalicilico, caratterizzati da meccanismi d'azione differenti. Tali associazioni sono utilizzate soprattutto nel trattamento del dolore acuto, compreso quello postoperatorio, odontoiatrico e muscoloscheletrico, con l'obiettivo di potenziare l'effetto analgesico mediante un approccio multimodale. Una revisione sistematica degli studi clinici disponibili ha mostrato che le associazioni contenenti basse dosi di codeina risultano generalmente più efficaci del placebo nel trattamento del dolore acuto, sebbene non siano sempre superiori ad altri analgesici non oppioidi (47).

Come gli altri oppioidi, anche la codeina presenta un potenziale di uso improprio, abuso e dipendenza. L'assunzione regolare, prolungata o a dosi superiori a quelle raccomandate può favorire lo sviluppo di tolleranza, rendendo necessario un progressivo aumento della dose per ottenere gli effetti desiderati. L'uso improprio può avere origine da un trattamento analgesico protratto, dall'automedicazione non controllata oppure dalla ricerca degli effetti psicoattivi derivanti dalla conversione della codeina in morfina. Inoltre, la facile disponibilità di alcuni medicinali contenenti codeina e la natura spesso nascosta di tali modalità di consumo rendono inoltre difficile stimare l'effettiva diffusione del fenomeno (48).

Un rischio ulteriore riguarda le formulazioni combinate: l'assunzione di dosi elevate con l'obiettivo di aumentare l'esposizione alla codeina comporta inevitabilmente anche una eccessiva assunzione dei principi attivi non oppioidi, con possibili conseguenze tossiche gravi. Le evidenze attualmente disponibili non mostrano un'associazione chiara tra l'impiego di basse dosi, per periodi limitati e secondo le indicazioni terapeutiche, e lo sviluppo di un disturbo da uso di sostanze nei soggetti senza una precedente storia di dipendenza. Tuttavia, gli studi specificamente progettati per valutare tale rischio restano tuttavia limitati (47,48).

2.4 Diidrocodeina

La diidrocodeina è un oppioide semisintetico appartenente alla classe degli alcaloidi morfinanici, dotato di attività analgesica e antitussiva. È un analogo strutturale della codeina, dalla quale può essere ottenuta mediante idrogenazione del doppio legame presente tra gli atomi di carbonio 7 e 8 (49,50). La molecola fu sviluppata in Germania nel 1908 nell'ambito della ricerca di nuovi agenti antitussivi e venne successivamente introdotta in commercio nel 1911 (51).

In ambito clinico, la diidrocodeina viene impiegata principalmente nel trattamento del dolore di intensità lieve-moderata e nella soppressione della tosse. In alcuni casi, può essere utilizzato per il trattamento della dipendenza da oppioidi (50).

Presenta un profilo farmacologico simile a quello della codeina, rispetto alla quale mostra una maggiore potenza analgesica e può pertanto essere utilizzata come valida alternativa terapeutica (51,52).

2.4.1 Struttura chimica

La diidrocodeina è un oppioide semisintetico appartenente alla classe dei morfinani, con formula molecolare $C_{18}H_{23}NO_3$. Dal punto di vista strutturale è strettamente correlata alla codeina, dalla quale differisce per la saturazione del doppio legame presente tra gli atomi di carbonio in posizione 7 e 8. La riduzione di tale doppio legame determina la presenza di due atomi di idrogeno aggiuntivi rispetto alla codeina (49, 50, 51).

Analogamente alla codeina, la diidrocodeina presenta il caratteristico scheletro policiclico dei derivati morfinanici. La sua struttura comprende un anello aromatico, un ponte etereo 4,5-epossidico, un gruppo metossilico in posizione 3, un gruppo ossidrilico alcolico in posizione 6 e una funzione amminica terziaria N-metilata in posizione 17 (51).

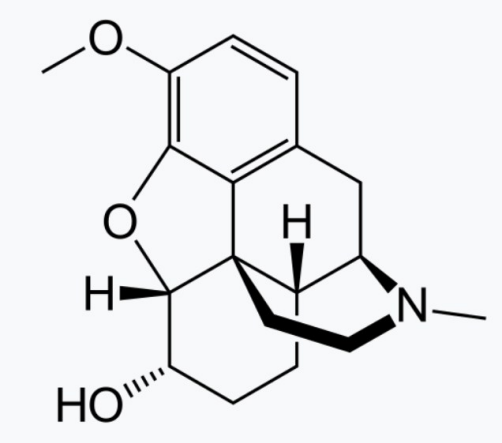


Figura 7: *Struttura della Diidrocodeina*

2.4.2 Farmacodinamica

La diidrocodeina esercita la propria attività farmacologica mediante interazione con i recettori oppioidi μ, δ e κ, mostrando la maggiore affinità nei confronti del sottotipo μ. Anche alcuni dei suoi metaboliti sono in grado di interagire con i recettori oppioidi; in particolare, la diidromorfina e la diidromorfina-6-O-glucuronide presentano un'affinità per il recettore μ almeno 70 volte superiore rispetto alla molecola parentale, mentre la nordiidrocodeina e la diidrocodeina-6-O-glucuronide mostrano un'affinità inferiore. Tali evidenze hanno suggerito un possibile contributo dei metaboliti, in particolare della diidromorfina, agli effetti farmacologici della diidrocodeina (53).

La formazione della diidromorfina avviene mediante O-demetilazione della diidrocodeina catalizzata dal CYP2D6, enzima caratterizzato da un marcato polimorfismo genetico; di conseguenza, la quantità di metabolita attivo prodotta può variare considerevolmente tra gli individui in funzione del fenotipo metabolico (54).

Tuttavia, la maggiore affinità recettoriale non implica necessariamente un maggiore contributo all'effetto analgesico *in vivo*. In uno studio condotto su volontari sani, mediante un modello farmacocinetico-farmacodinamico, l'andamento dell'effetto analgesico dopo somministrazione orale di diidrocodeina è risultato maggiormente correlato alle concentrazioni della molecola parentale rispetto a quelle della diidromorfina. Tali risultati suggeriscono, pertanto, che l'azione analgesica della diidrocodeina sia attribuibile principalmente alla molecola immodificata, sebbene i metaboliti dotati di elevata affinità recettoriale possano contribuire all'effetto complessivo (54).

2.4.3 Farmacocinetica

Dal punto di vista farmacocinetico, la diidrocodeina viene somministrata prevalentemente per via orale. Dopo somministrazione orale, viene assorbita relativamente rapidamente, raggiungendo le concentrazioni plasmatiche massime dopo circa 1,6–1,8 ore. La biodisponibilità orale risulta tuttavia limitata, con un valore medio pari a circa il 21%, a causa di un significativo metabolismo di primo passaggio. L'emivita plasmatica è compresa mediamente tra 3,3 e 4,5 ore. Gli studi condotti in seguito a somministrazione endovenosa hanno inoltre evidenziato un profilo farmacocinetico compatibile con un modello di distribuzione bicompartimentale (55).

La diidrocodeina viene metabolizzata attraverso diverse vie metaboliche, tra cui O-demetilazione, N-demetilazione e glucuronidazione. L'O-demetilazione, catalizzata principalmente dall'enzima CYP2D6, determina la formazione della diidromorfina, mentre la N-demetilazione, mediata prevalentemente dagli enzimi della famiglia CYP3A, porta alla formazione della nordiidrocodeina. Poiché il CYP2D6 è caratterizzato da polimorfismo genetico, la capacità di formare diidromorfina può variare considerevolmente tra individui con diverso fenotipo metabolico (56).

Un'importante via metabolica è inoltre rappresentata dalla glucuronidazione, con formazione della diidrocodeina-6-O-glucuronide. Studi condotti sull'escrezione urinaria hanno evidenziato che la diidrocodeina-6-O-glucuronide, la diidrocodeina immodificata e la nordiidrocodeina rappresentano i principali composti rilevabili nelle urine dopo la somministrazione della sostanza. La diidrocodeina e la diidromorfina risultano presenti anche in forma coniugata, mentre la nordiidrocodeina e la nordiidromorfina sono scarsamente o per nulla coniugate (57).

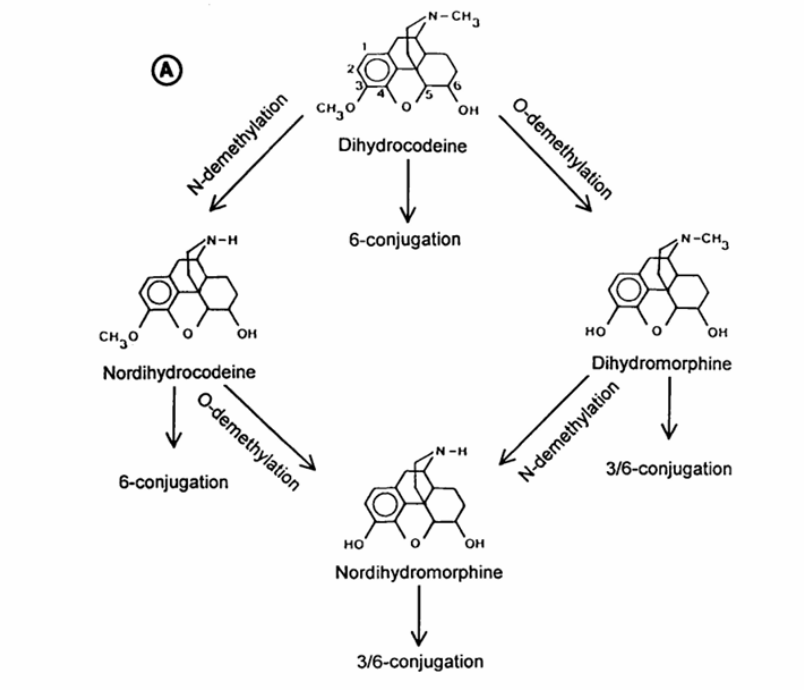


***Figura 8**: Metabolismo della diidrocodeina (57)*

Dal punto di vista quantitativo, la glucuronidazione rappresenta una delle principali vie metaboliche della diidrocodeina. Dopo la somministrazione di una singola dose orale di 60 mg, Ammon et al. (1999) hanno osservato che circa il 49,3% della dose veniva recuperato nelle urine sotto forma di diidrocodeina glucuronidata e circa il 23,5% come diidrocodeina immodificata, mentre la diidromorfina, considerando complessivamente la forma libera e quella coniugata, rappresentava circa il 5,4% della dose. La conversione a diidromorfina costituisce pertanto una via quantitativamente minoritaria rispetto alla glucuronidazione, nonostante la rilevanza farmacologica di questo metabolita (58).

L'eliminazione della diidrocodeina e dei suoi metaboliti avviene prevalentemente per via urinaria. Hufschmid et al. (1995) hanno osservato che circa il 30% della dose veniva recuperato nelle urine nelle prime 8 ore dopo la somministrazione e che i principali composti escreti entro 24 ore erano rappresentati dalla diidrocodeina, dalla diidrocodeina-6-O-glucuronide e dalla nordiidrocodeina. Infine, nell'intervallo di dosi compreso tra 60 e 120 mg, la diidrocodeina e la diidromorfina hanno mostrato una farmacocinetica lineare nei soggetti CYP2D6 extensive metabolizers (EM), con un incremento proporzionale dell'esposizione sistemica all'aumentare della dose (58).

3. Matrice ematica

3.1 Composizione e caratteristiche del sangue intero

Il sangue è un tessuto connettivo specializzato costituito da elementi corpuscolati, comprendenti eritrociti (globuli rossi), leucociti (globuli bianchi) e trombociti (piastrine), e da una componente liquida, rappresentata dal plasma, nella quale tali elementi sono sospesi. Il plasma rappresenta circa il 55% del volume ematico ed è costituito principalmente da acqua (90-92%), nella quale sono disciolti elettroliti, nutrienti, metaboliti, ormoni e proteine plasmatiche, tra cui albumina, globuline e fibrinogeno. Gli elementi corpuscolati costituiscono invece la restante frazione del sangue e, tra questi, gli eritrociti rappresentano la componente cellulare più abbondante (59).

Gli eritrociti sono cellule altamente specializzate, caratterizzate da una forma a disco biconcavo, dall'assenza di nucleo e organelli e da un elevato contenuto di emoglobina, responsabile principalmente del trasporto dell'ossigeno dai polmoni ai tessuti. Inoltre, gli eritrociti partecipano al trasporto dell'anidride carbonica dai tessuti ai polmoni, che avviene prevalentemente sotto forma di bicarbonato. Nel sangue umano sono presenti circa 4-5 milioni di eritrociti per microlitro e, grazie alla loro elevata numerosità, all'ampia superficie di membrana e alla capacità di raggiungere praticamente tutti i tessuti dell'organismo, essi svolgono un ruolo rilevante anche nel trasporto di numerose molecole endogene ed esogene (60,61).

Dal punto di vista farmacologico e tossicologico, il sangue intero costituisce una matrice biologica complessa, nella quale gli xenobiotici possono distribuirsi in maniera differenziale tra la componente plasmatica e quella cellulare. Le molecole presenti in circolo possono infatti rimanere libere nel plasma, legarsi alle proteine plasmatiche oppure interagire con gli eritrociti, associandosi alla membrana o penetrando al loro interno. Tale distribuzione dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del composto, quali lipofilia e dimensioni molecolari, nonché dall'affinità per specifici siti di legame e dalla presenza di sistemi di trasporto eritrocitari (60).

3.2 Distribuzione degli xenobiotici nel sangue e rilevanza tossicologica

Una volta presenti nella circolazione ematica, gli xenobiotici possono distribuirsi in maniera differente tra il comportamento plasmatico e il compartimento eritrocitario. Nel plasma, le molecole possono trovarsi in forma libera oppure legate alle proteine

plasmatiche, mentre una parte può associarsi agli eritrociti, interagendo con la membrana cellulare o penetrando al loro interno. La distribuzione nel compartimento eritrocitario è influenzata dalle caratteristiche chimico-fisiche del composto, quali la lipofilia e le dimensioni molecolari, nonché dalla sua affinità per specifici siti di legame. Le molecole lipofile e di piccole dimensioni possono attraversare la membrana eritrocitaria prevalentemente mediante diffusione passiva, mentre i composti maggiormente idrofili possono avvalersi di canali o sistemi di trasporto presenti sulla membrana. Una volta all'interno del citoplasma dell'eritrocita, gli xenobiotici possono interagire con diverse componenti intracellulari, tra cui l'emoglobina e altre proteine citosoliche, alcune delle quali caratterizzate da attività enzimatica. La distribuzione dello xenobiotico tra plasma ed eritrociti risulta quindi dall'equilibrio tra i processi di ingresso e di efflusso attraverso la membrana eritrocitaria e dalla sua affinità per i diversi siti di legame presenti nei due compartimenti (60).

La diversa ripartizione degli xenobiotici tra plasma ed eritrociti può essere descritta mediante il rapporto sangue/plasma (*blood-to-plasma ratio*, Rb), definito come il rapporto tra la concentrazione del composto nel sangue intero e quella plasmatica (62). Tale parametro permette di valutare la tendenza di un composto a distribuirsi nella componente eritrocitaria del sangue e assume particolare rilevanza nella scelta della matrice biologica da sottoporre ad analisi. In presenza di una significativa distribuzione eritrocitaria, infatti, la concentrazione plasmatica può non rappresentare adeguatamente la concentrazione complessiva del composto nel sangue; in questi casi, l'analisi del sangue intero può fornire una misura più rappresentativa della concentrazione complessiva del composto nella matrice ematica (60).

Il sangue intero rappresenta una delle matrici biologiche convenzionalmente utilizzate nelle analisi tossicologiche, insieme al plasma e all'urina(63,64). La determinazione degli xenobiotici nel sangue consente di ottenere informazioni relative a un'esposizione recente, poiché questa matrice riflette principalmente la presenza del composto nell'organismo in prossimità del momento del prelievo (65). A differenza del sangue, matrici quali il capello consentono di ricostruire esposizioni pregresse su intervalli temporali più estesi (64). Per questo motivo, la matrice ematica trova ampia applicazione sia in ambito clinico sia in tossicologia forense, soprattutto quando è richiesta la determinazione quantitativa di farmaci, sostanze d'abuso e relativi metaboliti (63).

Oltre alle caratteristiche proprie dello xenobiotico, l'interpretazione dei risultati ottenuti dall'analisi del sangue deve tenere conto delle condizioni preanalitiche. Le modalità di raccolta, conservazione e stoccaggio del campione possono infatti influenzare la stabilità degli analiti e, di conseguenza, le concentrazioni misurate. In particolare, la temperatura e la durata della conservazione rappresentano fattori rilevanti per preservare l'integrità del campione e garantire l'affidabilità del dato analitico, soprattutto nel caso di composti caratterizzati da limitata stabilità nella matrice ematica (66).

3.3 Prelievo e gestione dei campioni ematici in ambito tossicologico-forense

In ambito tossicologico-forense, le modalità di raccolta e gestione dei campioni ematici rappresentano un aspetto rilevante ai fini della corretta interpretazione dei risultati analitici. Nei soggetti viventi, il sangue viene generalmente prelevato mediante venipuntura, utilizzando dispositivi e contenitori idonei alla successiva analisi tossicologica. La scelta dell'anticoagulante, il volume di campione raccolto, le condizioni di conservazione e il tempo intercorso tra il prelievo e l'analisi possono infatti influenzare la stabilità degli analiti e la qualità del risultato analitico.

Nel contesto post-mortem, il campionamento ematico presenta caratteristiche differenti rispetto al soggetto vivente (67). La sede di prelievo assume particolare rilevanza, poiché i fenomeni di redistribuzione post-mortem possono determinare variazioni delle concentrazioni degli xenobiotici nei diversi distretti vascolari (68). Per tale ragione, quando possibile, il sangue destinato alle analisi tossicologiche viene preferibilmente raccolto da sedi periferiche, considerate meno suscettibili ai fenomeni di redistribuzione rispetto al sangue proveniente dalle cavità cardiache o da sedi centrali (69).

Tale aspetto risulta particolarmente rilevante nel caso della morfina: studi condotti su campioni post-mortem hanno evidenziato differenze nelle concentrazioni della morfina e dei suoi metaboliti in relazione alla sede e alle modalità di prelievo, sottolineando l'importanza della corretta interpretazione del dato tossicologico (70).

L'intervallo post-mortem, le condizioni di conservazione e l'eventuale degradazione degli analiti devono pertanto essere considerati nell'interpretazione dei risultati.

La distinzione tra campioni ottenuti da soggetti viventi e campioni post-mortem risulta pertanto particolarmente importante in tossicologia forense, poiché le concentrazioni

determinate nel sangue non riflettono necessariamente le medesime condizioni fisiologiche e farmacocinetiche. L'interpretazione del dato analitico deve quindi essere effettuata considerando la modalità e la sede di prelievo, le condizioni di conservazione del campione e il contesto tossicologico e medico-legale del caso.

3.4 Dried Blood Spots (DBS)

I *Dried Blood Spots* (DBS) rappresentano una tecnica di microsampling che prevede la deposizione di piccoli volumi di sangue su un apposito supporto assorbente, generalmente costituito da carta da filtro, e la successiva essiccazione del campione (71). Una volta essiccato, lo spot può essere sottoposto ad analisi mediante il prelievo di una porzione di dimensioni definite (*punch*) oppure attraverso l'utilizzo dell'intero spot, seguito dall'estrazione degli analiti dal supporto (71,72). Il DBS costituisce pertanto una modalità alternativa di raccolta e conservazione del sangue intero, compatibile con differenti tecniche bioanalitiche, tra cui la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (72).

Rispetto al campionamento convenzionale del sangue, l'impiego dei DBS presenta diversi vantaggi. In particolare, richiede volumi ridotti di campione, generalmente nell'ordine di poche decine di microlitri, e permette di semplificare le procedure di raccolta, trasporto e conservazione (71,72). L'essiccazione del campione può inoltre ridurre il rischio biologico associato alla manipolazione del sangue e, per alcuni analiti, contribuire a migliorarne la stabilità durante la conservazione (65,72). Tali caratteristiche hanno favorito l'applicazione dei DBS in differenti ambiti, tra cui il monitoraggio terapeutico dei farmaci e la tossicologia clinica e forense (71,72).

Nonostante tali vantaggi, l'analisi quantitativa mediante DBS presenta alcune criticità che devono essere considerate durante lo sviluppo e la validazione del metodo. Una delle principali è rappresentata dall'effetto dell'ematocrito. L'ematocrito rappresenta il rapporto tra il volume occupato dagli eritrociti e il volume totale del sangue (73). Variazioni della frazione eritrocitaria modificano infatti le proprietà fisiche del sangue e il suo comportamento durante la diffusione sul supporto. In particolare, all'aumentare dell'ematocrito si osservano variazioni nei tempi di assorbimento, nelle dimensioni e nelle caratteristiche dello spot e, soprattutto, nel volume effettivo di sangue presente in un punch di dimensioni definite. Di conseguenza, campioni caratterizzati da valori

differenti di ematocrito possono determinare una diversa quantità di matrice sottoposta ad analisi, introducendo un potenziale bias nella quantificazione degli analiti (74). Anche il volume di sangue depositato e la porzione dello spot selezionata per l'analisi possono contribuire alla variabilità del risultato. L'utilizzo dell'intero spot può rappresentare una possibile strategia per limitare alcune delle variazioni associate alla distribuzione non uniforme del sangue e degli analiti sul supporto (72).

Ulteriori aspetti critici riguardano il ridotto quantitativo di campione disponibile, che può rendere più difficile il raggiungimento di un'adeguata sensibilità analitica (75). L'efficienza di estrazione e, più in generale, le prestazioni del metodo possono inoltre essere influenzate dalle caratteristiche del supporto utilizzato, dalle modalità di essiccazione e conservazione e dall'interazione tra analita, matrice ematica e procedura estrattiva (65,75). Per tali ragioni, le procedure di preparazione ed estrazione devono essere opportunamente ottimizzate e validate in funzione degli analiti considerati (65,75).

Negli ultimi anni, l'impiego dei DBS ha acquisito crescente interesse anche nell'ambito della tossicologia forense e, in particolare, per la determinazione di sostanze psicoattive e sostanze d'abuso (65,72). Studi condotti su campioni reali hanno evidenziato una buona concordanza qualitativa e, per numerosi composti, quantitativa tra i risultati ottenuti nel sangue non essiccato e quelli derivanti dall'analisi dei DBS (72). Analogamente, metodiche LC-MS/MS sviluppate per l'analisi parallela di sangue intero e DBS hanno mostrato una buona correlazione tra le due modalità di campionamento anche per sostanze d'abuso, tra cui la morfina (75). L'applicabilità delle tecniche di *dried matrix spot* alla determinazione di oppiacei e oppioidi è stata inoltre documentata per diverse molecole e relativi metaboliti, comprendenti morfina, codeina e 6-acetilmorfina, evidenziando il potenziale di questo approccio nell'analisi tossicologica di tali sostanze (65).

4. LC-MS/MS

4.1 Cromatografia liquida

La cromatografia è una tecnica di separazione ampiamente utilizzata in ambito analitico, che consente di separare i diversi componenti di una miscela sulla base delle loro differenti caratteristiche e interazioni con il sistema cromatografico. Essa trova applicazione sia nell'analisi qualitativa sia quantitativa e può essere impiegata per la separazione, l'identificazione e la purificazione delle sostanze presenti in un campione (76).

Il principio generale su cui si basa la cromatografia consiste nella diversa interazione degli analiti con due fasi: una fase stazionaria e una fase mobile. Durante il processo cromatografico, i componenti della miscela interagiscono in misura differente con le due fasi; le sostanze maggiormente trattenute dalla fase stazionaria procedono più lentamente e presentano, di conseguenza, tempi di ritenzione maggiori, mentre quelle che interagiscono in misura minore con la fase stazionaria vengono eluite più rapidamente. Le differenti interazioni instaurate dagli analiti con la fase mobile e con la fase stazionaria permettono quindi la separazione dei componenti della miscela (76).

Poiché la natura della fase mobile rappresenta uno degli elementi distintivi delle diverse tecniche cromatografiche, queste possono essere classificate anche in funzione del suo stato fisico. Quando la fase mobile è costituita da un liquido si parla di cromatografia liquida (Liquid Chromatography, LC), mentre quando è costituita da un gas si parla di gascromatografia (Gas Chromatography, GC) (76).

Analogamente alla fase mobile, anche la fase stazionaria può presentare natura differente e può essere costituita da un materiale solido oppure da una fase liquida disposta sulla superficie di un supporto solido. Il tipo di interazione che si instaura tra gli analiti, la fase mobile e la fase stazionaria determina le modalità con cui avviene la separazione. In funzione del meccanismo coinvolto, tra le principali tecniche cromatografiche si distinguono la cromatografia di ripartizione, di adsorbimento, a scambio ionico e ad esclusione dimensionale (76).

Tra i diversi meccanismi di separazione, nel meccanismo di ripartizione, la separazione è legata alla diversa tendenza degli analiti a distribuirsi tra la fase mobile e la fase stazionaria. I composti che permangono maggiormente nella fase stazionaria vengono

trattenuti più a lungo e presentano quindi tempi di ritenzione maggiori, mentre quelli che tendono a permanere nella fase mobile vengono eluiti più rapidamente (76).

Nell'ambito della cromatografia liquida, lo sviluppo di sistemi strumentali in grado di operare a pressioni elevate ha portato all'affermazione della cromatografia liquida ad alte prestazioni (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC). L'utilizzo di fasi stazionarie costituite da particelle di dimensioni ridotte consente di migliorare l'efficienza della separazione cromatografica; tuttavia, la diminuzione delle dimensioni delle particelle determina un aumento della resistenza al flusso della fase mobile e richiede pertanto l'impiego di pressioni operative più elevate (77).

4.2 Fase mobile

La fase mobile costituisce la componente liquida che attraversa la colonna durante il processo cromatografico. Essa può essere costituita da un singolo solvente oppure da una miscela di solventi opportunamente selezionati, eventualmente contenente specifici additivi o modificatori. In alcuni metodi, l'acidificazione della fase mobile può contribuire a migliorare la risoluzione cromatografica, la definizione dei picchi e la separazione dei componenti presenti in miscele complesse. Il tipo e la composizione della fase mobile rappresentano parametri rilevanti per il processo cromatografico, in quanto possono influenzare la separazione dei diversi componenti della miscela (78).

La composizione della fase mobile può essere mantenuta costante oppure modificata durante l'analisi. Nel primo caso si parla di eluizione isocratica, nella quale le proporzioni dei componenti della fase mobile rimangono invariate per l'intera separazione. Nell'eluizione in gradiente, invece, le proporzioni dei componenti della fase mobile vengono modificate nel corso della corsa cromatografica (78).

Quando la cromatografia liquida viene accoppiata alla spettrometria di massa, la composizione della fase mobile deve essere scelta tenendo conto non soltanto delle esigenze della separazione cromatografica, ma anche della compatibilità con il processo di ionizzazione. I modificatori presenti nella fase mobile possono infatti influenzare sia le prestazioni cromatografiche sia la risposta ottenuta mediante ionizzazione electrospray (ESI). Tra gli additivi utilizzati nelle applicazioni LC-MS rientra l'acido formico, che presenta una minore soppressione del segnale in ESI rispetto ad altri modificatori, come l'acido trifluoroacetico (79).

4.3 Fase stazionaria

La fase stazionaria rappresenta la componente del sistema cromatografico con la quale gli analiti instaurano interazioni durante il passaggio attraverso la colonna. La sua natura chimica e le caratteristiche del materiale che la costituisce influenzano la ritenzione degli analiti e la selettività della separazione, in quanto il comportamento cromatografico dipende dall'insieme delle interazioni fisico-chimiche che si stabiliscono tra gli analiti e la superficie della fase stazionaria. Tra queste rientrano principalmente le forze di Van Der Waals, le interazioni elettrostatiche e i legami a idrogeno, il cui contributo relativo varia in funzione delle caratteristiche chimiche dell'analita e della fase stazionaria (80).

La silice è tra i materiali maggiormente impiegati per la preparazione delle fasi stazionarie in cromatografia liquida. La superficie della silice convenzionale è caratterizzata principalmente dalla presenza di gruppi silanolici (Si–OH), responsabili delle caratteristiche polari del materiale e in grado di partecipare alle interazioni con gli analiti (81).

I gruppi silanolici presenti sulla superficie possono inoltre essere sottoposti a modificazione chimica mediante il legame di differenti gruppi organici, consentendo di ottenere fasi stazionarie chimicamente legate (*bonded stationary phases*). La funzionalizzazione della superficie permette di modificare le proprietà chimico-fisiche della fase stazionaria e, di conseguenza, il tipo e l'intensità delle interazioni che questa può instaurare con gli analiti, influenzandone la ritenzione e la selettività cromatografica (80,81).

In funzione della polarità relativa della fase stazionaria e della fase mobile, la cromatografia liquida può essere condotta secondo differenti modalità. Nella cromatografia in fase normale (*Normal-Phase Liquid Chromatography*, NP-LC) viene impiegata una fase stazionaria polare, come la silice o fasi contenenti gruppi polari, quali gruppi diolici, ciano o amminici, associata a una fase mobile meno polare. Nella cromatografia in fase inversa (*Reversed-Phase Liquid Chromatography*, RP-LC), invece, la fase stazionaria presenta caratteristiche meno polari e prevalentemente idrofobiche, mentre la fase mobile è relativamente più polare. Tra le fasi stazionarie maggiormente utilizzate in RP-LC rientrano quelle ottenute mediante il legame alla superficie della silice di catene alchiliche, quali gruppi ottilici (C8) e octadecilici (C18) (82).

Nella cromatografia in fase inversa, la natura del gruppo funzionale legato alla superficie della silice contribuisce a determinare la selettività della fase stazionaria. Oltre alle tradizionali fasi alchiliche (C8 e C18), possono essere impiegate fasi contenenti gruppi aromatici, quali le fasi feniliche e bifeniliche. La presenza di sistemi aromatici sulla superficie della fase stazionaria consente l'instaurarsi di interazioni π–π con analiti contenenti anelli aromatici o altri sistemi elettronici π. Tali interazioni possono contribuire alla ritenzione e conferire alla fase stazionaria una selettività differente rispetto a quella delle comuni fasi C18, nelle quali prevalgono principalmente le interazioni di natura idrofobica e dispersiva.

Un ulteriore elemento che caratterizza le moderne fasi stazionarie è rappresentato dalla struttura delle particelle di silice impiegate per il riempimento della colonna. Accanto alle particelle completamente porose (*fully porous particles*, FPP), nelle quali la struttura porosa interessa l'intera particella, sono state sviluppate particelle superficialmente porose (*superficially porous particles*, SPP), definite anche *core-shell*. Queste ultime sono costituite da un nucleo interno non poroso circondato da uno strato esterno poroso. Tale configurazione riduce il percorso di diffusione degli analiti all'interno della particella e consente di ottenere elevate efficienze cromatografiche, mantenendo pressioni operative più contenute rispetto a quelle richieste da particelle completamente porose di dimensioni molto ridotte (80).

Nel presente lavoro è stata utilizzata una colonna Kinetex® Biphenyl (Phenomenex), appartenente alla categoria delle fasi stazionarie in fase inversa e costituita da particelle core-shell. La fase Biphenyl è caratterizzata dalla presenza di gruppi aromatici bifenilici e presenta una selettività differente rispetto alle tradizionali fasi C18. Oltre alle interazioni di natura idrofobica, questa fase può instaurare interazioni π–π e dipolo–dipolo, che contribuiscono alla ritenzione e alla separazione di composti con differenti caratteristiche strutturali e di polarità (83).

4.4 Componenti di un sistema LC

Un sistema HPLC è costituito da diversi moduli collegati in sequenza, ciascuno dei quali svolge una specifica funzione nel trasporto della fase mobile, nell'introduzione del campione, nella separazione degli analiti e nella loro successiva rivelazione. Tra le principali componenti rientrano i serbatoi della fase mobile, il sistema di degasaggio e

miscelazione, la pompa, il sistema di iniezione, la colonna cromatografica, il rivelatore e il sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati.

La fase mobile è contenuta in appositi serbatoi, denominati *reservoir*, dai quali viene prelevata e convogliata all'interno del sistema. Quando vengono utilizzati più solventi, questi possono essere prelevati da reservoir differenti e miscelati nelle proporzioni previste dal metodo cromatografico. Prima dell'ingresso nel circuito, la fase mobile può essere sottoposta a degasaggio al fine di ridurre la presenza di gas disciolti, la cui formazione di bolle potrebbe interferire con il corretto funzionamento del sistema cromatografico e del sistema di rivelazione.

La pompa ha il compito di prelevare la fase mobile dai reservoir e di farla fluire attraverso il sistema e la colonna cromatografica, generando la pressione necessaria e garantendo un flusso controllato e riproducibile.

L'introduzione del campione nel sistema può essere effettuata manualmente oppure mediante sistemi automatizzati. Nell'iniezione manuale vengono comunemente utilizzate valvole a loop, come quelle di tipo *Rheodyne*, costituite da una valvola rotativa e da un circuito di volume definito. In posizione *LOAD* il campione viene introdotto nel loop mediante una siringa, mentre il passaggio alla posizione *INJECT* inserisce il loop nel percorso della fase mobile, che trasporta il campione verso la colonna. Nei sistemi automatizzati, l'autosampler consente invece di effettuare in modo programmato e riproducibile l'iniezione di una sequenza di campioni.

La colonna cromatografica contiene la fase stazionaria e rappresenta il compartimento nel quale ha luogo la separazione degli analiti in funzione delle differenti interazioni instaurate con il sistema cromatografico. Una volta eluiti dalla colonna, gli analiti raggiungono il rivelatore. In HPLC possono essere utilizzati differenti sistemi di rivelazione, tra cui rivelatori UV/Vis, a fluorescenza, elettrochimici, a indice di rifrazione, a diffusione della luce e spettrometri di massa, la cui scelta dipende dalle caratteristiche degli analiti e dalle finalità dell'analisi.

Nel caso della spettrometria di massa, gli analiti vengono convertiti in specie ioniche e successivamente discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica (m/z). Nel presente lavoro la cromatografia liquida è stata accoppiata alla spettrometria di massa

tandem (LC-MS/MS). Il segnale generato dal sistema di rivelazione viene infine registrato ed elaborato mediante un apposito sistema informatico, consentendo la visualizzazione e l'analisi dei dati cromatografici (84).

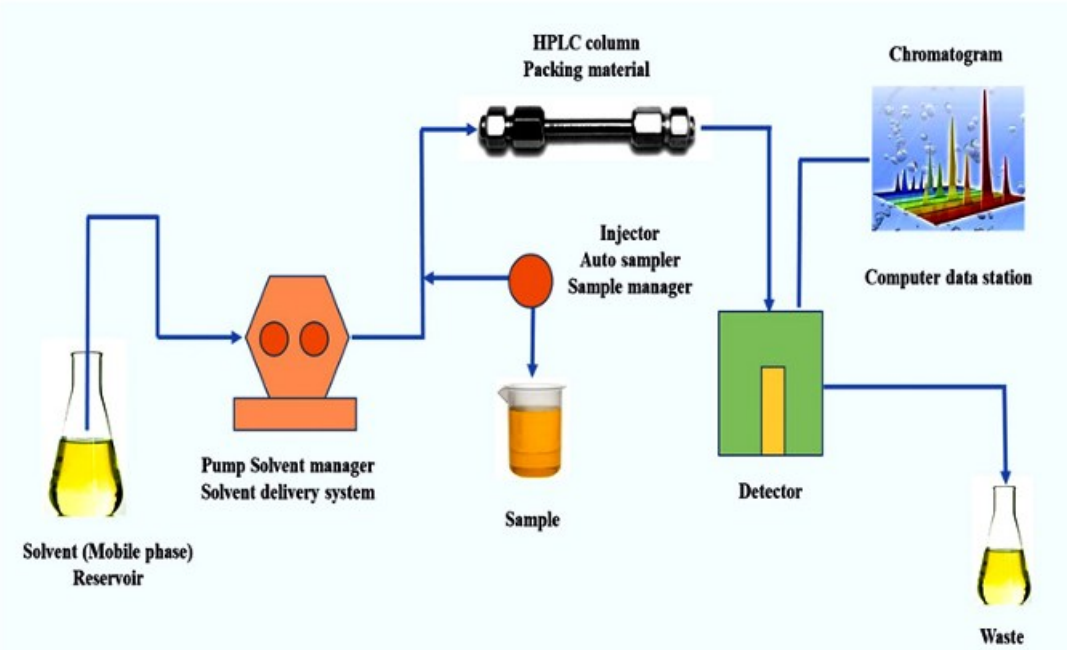


***Figura 9**: Schema a blocchi di HPLC (84)*

4.5 Spettrometria di massa

La spettrometria di massa (*Mass Spectrometry*, MS) è una tecnica analitica basata sulla conversione delle specie chimiche in ioni in fase gassosa, successivamente separati e rivelati in funzione del loro rapporto massa/carica. Gli ioni prodotti vengono discriminati sulla base del parametro *m/z*, definito come il rapporto tra la massa dello ione e il valore assoluto del suo numero di carica. I segnali ottenuti vengono rappresentati in uno spettro di massa, nel quale l'abbondanza relativa degli ioni è riportata in funzione dei corrispondenti valori di *m/z*. Un sistema di spettrometria di massa comprende pertanto una sorgente di ionizzazione, deputata alla formazione degli ioni, un analizzatore di massa, che ne consente la separazione, e un sistema di rivelazione (85).

Nell'accoppiamento con la cromatografia liquida, una delle tecniche di ionizzazione maggiormente utilizzate è l'ionizzazione electrospray (*Electrospray Ionization*, ESI), una tecnica di ionizzazione soft particolarmente adatta all'analisi di composti polari e termolabili. Nella sorgente ESI, la soluzione contenente gli analiti viene introdotta attraverso un capillare sottoposto a un'elevata differenza di potenziale generalmente

nell'ordine di 2-3 kV. L'azione del campo elettrico determina la deformazione del menisco della soluzione fino alla formazione del cosiddetto cono di Taylor, dal quale vengono generate goccioline altamente cariche. Durante il loro trasferimento verso l'ingresso dello spettrometro, la progressiva evaporazione del solvente determina una riduzione delle dimensioni delle goccioline e un aumento della densità di carica sulla loro superficie. Quando la repulsione elettrostatica supera la tensione superficiale, le goccioline vanno incontro a fissione coulombiana; la ripetizione dei processi di evaporazione e fissione conduce progressivamente alla formazione di ioni in fase gassosa, successivamente trasferiti all'analizzatore di massa (85).

La sorgente ESI può operare in modalità di ionizzazione positiva o negativa, consentendo rispettivamente la rivelazione di specie ioniche a carica positiva o negativa. In modalità positiva vengono comunemente osservate specie protonate, mentre in modalità negativa possono essere generate specie deprotonate. La modalità di ionizzazione viene pertanto selezionata in funzione delle proprietà chimiche e acido-base degli analiti e della loro capacità di formare specie ioniche nelle condizioni sperimentali adottate (85).

Tra gli analizzatori comunemente impiegati nella spettrometria di massa rientra il quadrupolo, costituito da quattro barre parallele alle quali vengono applicate combinazioni di potenziali a corrente continua (DC) e a radiofrequenza (RF). L'applicazione di tali campi elettrici determina la stabilità o l'instabilità della traiettoria degli ioni in funzione del loro valore di *m/z*, consentendo il passaggio attraverso l'analizzatore soltanto agli ioni che presentano traiettorie stabili nelle condizioni selezionate (86).

Nei sistemi a triplo quadrupolo, tre elementi quadrupolari sono disposti in sequenza. Il primo quadrupolo (Q1) opera come filtro di massa e consente di selezionare uno specifico ione precursore; il secondo quadrupolo (q2), generalmente utilizzato come cella di collisione, permette la frammentazione dello ione selezionato mediante collisioni con un gas neutro secondo un processo di dissociazione indotta da collisione (*Collision-Induced Dissociation*, CID). Gli ioni prodotti vengono successivamente trasferiti al terzo quadrupolo (Q3), che ne consente la selezione in funzione del valore di *m/z* prima della rivelazione. Tale configurazione permette di effettuare analisi in spettrometria di massa

tandem (MS/MS), aumentando la selettività dell'analisi attraverso la selezione sequenziale dello ione precursore e dei relativi ioni prodotto (85,86).

Tra le modalità di acquisizione impiegate nei sistemi a triplo quadrupolo rientra il *Selected Reaction Monitoring* (SRM), nel quale viene selezionato uno specifico ione precursore e vengono monitorati uno o più ioni prodotto caratteristici derivanti dalla sua frammentazione. Quando nel corso dell'analisi vengono monitorate più transizioni precursore-prodotto si parla di *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). La selezione combinata di uno specifico ione precursore e di uno dei suoi caratteristici ioni prodotto conferisce elevata selettività all'analisi, riducendo il contributo di specie interferenti presenti nel campione. Per tale motivo, la modalità SRM/MRM trova ampia applicazione nella quantificazione mirata di composti organici, anche in matrici biologiche complesse (85).

5. Scopo della Tesi

La presente tesi si inserisce nell'ambito del progetto di ricerca PRIN *NO PANIC* (New and Old Psychoactive drugs Abuse and Neuroenhancers use Investigation among Current University Students), finalizzato allo studio del consumo di sostanze psicoattive e neurostimolanti nella popolazione universitaria mediante l'integrazione di dati anamnestici e analisi tossicologiche su matrici biologiche. In tale contesto, il lavoro ha avuto come obiettivo lo sviluppo e la validazione, secondo le linee guida internazionali vigenti, di un metodo analitico basato su cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) per la determinazione quantitativa di morfina, 6-monoacetilmorfina (6-MAM), codeina e diidrocodeina in sangue intero e campioni di *dried blood spots* (DBS).

L'introduzione della matrice DBS è finalizzata a ridurre il volume di sangue necessario per il campionamento, semplificare le procedure di raccolta, trasporto e conservazione dei campioni e ampliare le potenzialità applicative del protocollo analitico. Contestualmente, l'inclusione degli oppioidi oggetto di studio consente di estendere il pannello delle sostanze ricercate nell'ambito del progetto, migliorando la capacità di identificare l'esposizione a sostanze d'abuso mediante un approccio analitico sensibile, selettivo e applicabile sia in ambito clinico sia tossicologico-forense.

6. Materiali e metodi

6.1 Sostanze pure e reagenti

Sono stati utilizzati i seguenti standard tutti in dotazione al Laboratorio di Analisi Chimico-Tossicologiche del Dipartimento di Medicina Legale, Scienze Forensi e Farmaco-tossicologiche "Antonio Fornari":

- Morfina 0,1 mg/mL in metanolo (LGC GmbH, Germania);
- 6-Acetilmorfina 1,0 mg/mL in 1mL acetonitrile (Cerilliant Corporation, Texas, USA);
- Diidrocodeina HCl 1,0 mg/mL in 1 mL metanolo (Cerilliant Corporation, Texas, USA);
- Codeina 0,1 mg/mL in metanolo (LGC GmbH, Germania);
- Morfina-D3 1 mg/mL in 1mL metanolo (Cerilliant Corporation, Texas, USA).

Per quanto riguarda i solventi, tutti corrispondenti ai criteri di purezza necessari per l'esecuzione dell'analisi mediante LC-MS/MS, sono stati impiegati:

- Metanolo (Carlo Erba, Italia);
- Tampone fosfato pH 6;
- HCl 0.1 M (0,828 mL HCl 37% in 100mL di acqua purificata di grado Milli-Q);
- Mix Diclorometano-Isopropanolo 8:2 con 2% di NH_4OH;
- Acqua purificata di grado Milli-Q, prodotta utilizzando la strumentazione MilliQ Simplicity 185 (Millipore);
- Acqua bidistillata.

L'acqua purificata di grado Milli-Q è utilizzata per la preparazione delle fasi mobili utilizzate nella cromatografia liquida è stata ottenuta mediante un sistema di purificazione Chemi Plus mod. 50 (General Waters, Bologna, Italia) e successivamente acidificata con acido formico (Fluka, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) fino a una concentrazione dello 0.1% v/v.

6.2 Vetreria, materiali da laboratorio e strumenti

Nel corso delle analisi finalizzate a questo progetto, sono stati utilizzate le seguenti apparecchiature di laboratorio:

- Bilancia Analitica AE 260 Delta Range, "Mettler Toledo", Milano, Italia;
- *Dried blood spot* (DBS, Specimen Collection Paper Whatman™, GE Healthcare Ltd, Forest Farm Industrial Estate, Cardiff, UK)
- Colonne SPE Agilent Bond Elut Certify;
- Pipette Eppendorf a volume fisso e variabile (1-20 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL, 50 µL, 1000 µL, 500-5000 µL);
- Pipette Pasteur di plastica;
- Provette di vetro da 10 mL a fondo conico;
- Agitatore vortex "VELP scientifica", Monza Brianza, Italia;
- Parafilm®;
- Vials in plastica (0,3 mL PP Snap Ring Micro-Vials, 32x11,6mm transparent);
- Tappi per vial;
- Forbici;
- Centrifuga "IEC CL10" (Thermo electron corporation);
- Sonicatore (STIMIN s.a.s, Milano)
- Camera estrattiva Supelco® Visiprep™ 12 DL (Merck);
- Cilindro graduato 50 mL;
- Cilindro graduato 100mL;
- Tappi di plastica monouso;
- Evaporatore a flusso di azoto "Reacti-Therm™", (Pierce);
- UPLC Agilent Serie 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipaggiata con colonna analitica Biphenyl Kinetex® 150x2.1 mm, 2.6 µm particle size, 100 Å-Penomenex;
- Spettrometro di massa a triplo quadrupolo SCIEX Qtrap 6500+ (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Foster City, CA, USA), nel quale il terzo quadrupolo può funzionare da trappola ionica lineare, equipaggiato con sorgente ionica ESI Turbo V™.

6.3 Campioni biologici

Le analisi finalizzate all'ottimizzazione del metodo LC-MS/MS per la determinazione di Morfina, 6-Acetilmorfina, Codeina e Diidrocodeina sono state condotte utilizzando campioni di sangue privi degli analiti di interesse. In particolare, sono stati impiegati campioni di sangue forniti da volontari del laboratorio e campioni precedentemente risultati negativi nell'ambito di indagini relative alle Commissioni Medico Locali Patenti e ai SERD (Servizi per le Dipendenze) locali. I campioni sono stati addizionati con gli standard analitici e gli standard interni di riferimento, al fine di ottenere campioni fortificati da utilizzare per l'ottimizzazione del metodo. Una parte dei campioni così preparati è stata analizzata come sangue intero, mentre un'altra aliquota è stata depositata su supporto cartaceo per la preparazione di *dried blood spot*, DBS.

Nell'ambito del progetto PRIN "NO PANIC", sono stati inoltre analizzati 190 campioni di DBS ottenuti da studenti di medicina, al fine di effettuare uno screening per la ricerca di morfina, 6-acetilmorfina, codeina e diidrocodeina. Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi per gli analiti oggetto di studio.

Al momento, non sono ancora pervenuti al Laboratorio di Tossicologia Forense dell'università di Pavia campioni reali positivi alle sostanze di interesse per cui non è stato possibile, nell'ambito di questo elaborato, procedere con l'applicazione delle metodiche descritte su questo tipo di campione.

6.3.1 Preparazione del campione

6.3.1.1 Allestimento campione di sangue

Per l'allestimento dei campioni di sangue intero sono stati prelevati 500 µL di sangue bianco e trasferiti in provette di vetro a fondo conico. I campioni sono stati successivamente addizionati con gli standard degli analiti a concentrazione nota, in funzione dei diversi punti della curva di calibrazione.

Da ciascuna provetta sono stati successivamente prelevati 50 µL, trasferiti in una nuova provetta a fondo conico, alla quale sono stati aggiunti 500 µL di tampone fosfato a pH 6 e lo standard interno a concentrazione nota. I campioni sono stati quindi sottoposti a vortex e centrifugati a 4000 rpm per 5 minuti, al fine di prepararli alla successiva procedura di estrazione in fase solida (*Solid Phase Extraction*, SPE).

6.3.1.2 Allestimento DBS

Per l'allestimento dei campioni DBS, la fase preliminare di addizionamento del sangue è stata eseguita secondo la medesima procedura adottata per i campioni di sangue intero.

Successivamente, 50 µL di sangue sono stati depositati sull'apposita cartuccia DBS. I campioni sono stati quindi lasciati essiccare *overnight*, a temperatura ambiente, a circa 25 °C, e al riparo dalla luce diretta.

In seguito, è stata ritagliata l'area corrispondente al campione e inserita in una provetta di vetro a fondo conico. A ciascun campione sono stati aggiunti 500 µL di tampone fosfato a pH 6 e lo standard interno a concentrazione nota. I campioni sono stati sottoposti a vortex e sonicazione per 10 minuti, seguita da centrifugazione a 4000 rpm per 5 minuti. Al termine di tali procedure, i campioni risultano pronti per la successiva purificazione mediante estrazione in fase solida (SPE).

6.3.2 Purificazione mediante SPE

Per entrambe le tipologie di campione, sangue intero e DBS, la purificazione degli analiti è stata effettuata mediante estrazione in fase solida, SPE.

Le colonnine SPE sono state inizialmente condizionate con 2 mL di metanolo, al fine di bagnare e attivare la fase stazionaria, seguiti da 2 mL di tampone fosfato, utilizzati per portare il sorbente nelle condizioni di pH previste per il successivo caricamento del campione. I campioni sono stati quindi caricati e la fase stazionaria è stata lavata sequenzialmente con 2 mL di acqua, 3 mL di HCl 0,1 M e 3 mL di metanolo. L'eluizione degli analiti è stata effettuata con 2 mL di miscela estrattiva costituita da diclorometano isopropanolo (8:2 v/v) con 2% di NH_4OH. L'eluato ottenuto è stato evaporato sotto flusso di azoto e successivamente risospeso in una miscela composta da 20 µL di metanolo e 80 µL di acqua. Il campione così ottenuto è stato trasferito in vial e sottoposto ad analisi mediante LC-MS/MS.

6.3.3 Caratterizzazione delle sostanze in MS/MS

La caratterizzazione delle sostanze attraverso ionizzazione e successiva separazione in triplo quadrupolo si è articolata in due passaggi analitici: la preparazione degli standard e l'ottimizzazione dei parametri di ionizzazione e rivelazione MS/MS. Per ciascuna sostanza è stata utilizzata una soluzione certificata: 6-Acetilmorfina e Diidrocodeina a una concentrazione di 1 mg/mL e Morfina e Codeina a 0,1 mg/mL. Per ottimizzare i

parametri di ionizzazione e di rivelazione MS/MS, è stato necessario preparare soluzioni a 1000 ng/mL in metanolo. Sono state preparate le singole soluzioni degli analiti, ad eccezione della Morfina-D3, il cui standard è già impiegato nel laboratorio e per il quale i parametri analitici risultano già ottimizzati. La soluzione a 1 μg/mL di ogni sostanza è stata infusa direttamente nello spettrometro di massa con un flusso di 50 μL/min tramite pompa a siringa. Il flusso di liquido in ingresso viene nebulizzato grazie al potenziale elettrico applicato all'ago (ionspray voltage) e al gas di nebulizzazione (Gas 1). Il nebulizzato viene indirizzato verso le lenti elettrostatiche poste all'ingresso dell'analizzatore di massa. Il foro posto tra le lenti stesse agisce da camera di desolvatazione ed evita l'entrata di vapori neutri di solvente nella zona dell'analizzatore. Questo effetto si ottiene grazie all'applicazione del curtain gas e di una differenza di potenziale, detta Declustering potential (DP), tra il foro e l'ago. Maggiore è la differenza di potenziale applicata maggiore sarà la desolvatazione. Il range di lavoro del DP in genere si aggira tra 0 e 200 V. Gli ioni passano quindi attraverso un primo quadrupolo detto Q0, che serve a focalizzare e guidare gli ioni lungo il percorso verso l'analizzatore. Questo processo è regolato da un parametro detto Entrace potential (EP), che generalmente viene impostato a 10 V per gli ioni in positive mode. Il Q0 serve a focalizzare e accelerare gli ioni ma non è in grado di selezionare e frammentare gli analiti. Per ciascun analita è stata individuata la polarità di ionizzazione utile a garantire le migliori condizioni di sensibilità analitica. Gli ioni generati, detti ioni pseudomolecolari o precursori ($[M+H]^+$ o $[M-H]^-$) vengono isolati nel primo quadrupolo (Q1), entrano nella cella di collisione (Q2), dove vengono frammentati. Alcuni parametri relativi alla cella di collisione posso essere ottimizzati in modo tale da frammentare lo ione precursore e individuarne i frammenti più abbondanti. In particolare, per ciascuno ione molecolare e per ciascun frammento generato sono stati valutati i seguenti parametri: Collision Energy (CE), Collision Cell Exit Potential (CXP) e Collision Gas (CAD). La Collision Energy (CE) è una differenza di potenziale tra il Q0 e la cella di collisione Q2 ed equivale all'energia che lo ione precursore riceve per essere accelerato nel Q2. Qui lo ione collide con il gas di collisione e si frammenta, generando gli ioni prodotto. In modalità positiva il CE può essere variato da 5 a 180 eV, mentre in modalità negativa da -5 a -180 eV. Il Collision Cell Exit Potential (CXP) ha la funzione di concentrare e accelerare gli ioni in uscita dalla cella di collisione (Q2) verso il terzo quadrupolo (Q3). Il CXP è relativo al

Q3 e può variare tra 0 e 55 V, per gli ioni positivi, e tra -55 e 0 V per quelli negativi. Il Collisionally Activated Dissociation (CAD) consiste mel processo di collisione degli ioni precursori con un gas neutro al fine di frammentare la molecola in ioni prodotto. Il Collision Gas, relativo al Q2, è stato mantenuto al livello $5 \cdot 10^{-5}$ torr per tutte le reazioni di frammentazione. La modalità operativa adottata consiste nel selezionare uno ione precursore nel primo quadrupolo (Q1) e nel monitorare più ioni prodotto nel Q3, riuscendo così a monitorare diverse transizioni ione precursore→ione prodotto; questa modalità è nota come Multiple Reaction Monitoring (MRM). L'acquisizione e l'elaborazione dei dati sono state effettuate con l'ausilio del software SCIEX OS® (versione 3.4.5.828 Applied Biosystems/MDS SCIEX). Ai fini di una maggiore chiarezza è stato ritenuto opportuno ed utile riportare in Tabella 1, che segue, i parametri di frammentazione e ionizzazione ottimizzati per ciascun analita preso in esame. In particolare, in tabella sono riportati i parametri con il maggio impatto diagnostico quali: l'Entrace potential (EP), il Declustering Potential (DP), il Collision Energy (CE) e il Collison Cell Exit Potential (CXP).

6.3.4 Sviluppo del metodo cromatografico

Una volta ottimizzati i parametri di ionizzazione di tutte le molecole di interesse, si è proceduto allo studio di un metodo cromatografico che soddisfacesse tutte le esigenze analitiche necessarie a garantire la corretta separazione e identificazione di ciascuna sostanza analizzata.

***Tabella 1**: Parametri di ionizzazione e transizioni ioniche degli analiti.*

Analita	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
Morfina	**286**	**201,2**	**71**	**8**	**39**	**9**
	286	229,1	71	8	37	11
6-Acetilmorfina	**328,1**	**193,2**	**114**	**9**	**41**	**9**
	328,1	211,1	114	9	37	10
Codeina	**300**	**215,2**	**145**	**10**	**34**	**10**
	300	243,1	145	10	34	12
Diidrocodeina	**303,1**	**202,1**	**99**	**8**	**43**	**10**
	303,1	246,2	99	8	35	12
Morfina-D3	**289,1**	**201,3**	**95**	**10**	**40**	**10**
	289,1	229,2	95	10	39	9

**Le righe evidenziate si riferiscono alle transizioni MRM utilizzate per la quantificazione dell'analita.*

L'analisi cromatografica è stata eseguita con un sistema UPLC Agilent 1260 Infinity II, costituito da un sistema di degasaggio sottovuoto, da una pompa binaria e da un microautocampionatore mantenuto a temperatura ambiente. L'ago di iniezione è sottoposto ad un triplice lavaggio con metanolo prima di ogni iniezione. La fase mobile consiste in una miscela di acido formico 0.1% in acqua (Fase A) e acido formico 0,1% in metanolo (Fase B). La separazione cromatografica è stata effettuata con una colonna analitica Biphenyl Kinetex® 150x2.1 mm, 2.6 µm particle size, 100 Å-Penomenex, mantenuta a 40°C durante tutta l'analisi. Prima dell'inizio dell'analisi la colonna viene equilibrata per 20 minuti. Il flusso è stato impostato a 350 µL/min e gradiente cromatografico utilizzato è stato il seguente: 0-2 min: 5% di B, 2-5 min: 5-70% B, 5-6 min: 70-90% B, 6-10 min: 90% di B, 10,1-18 min: 5% B.

***Tabella 2**: Parametri di eluizione cromatografica*

Tempo (min)	**Flusso (mL/min)**	**Fase A (%)**	**Fase B (%)**
0	350	95	5
2	350	95	5
5	350	30	70
6	350	10	90
10	350	10	90
10,01	350	95	5
18	350	95	5

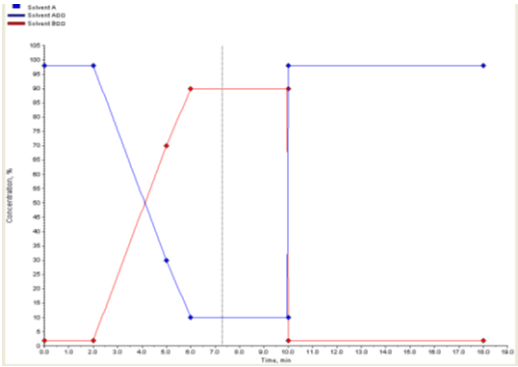


***Figura 10**: Rappresentazione grafica del gradiente. Fase A blu e Fase B rosso*

6.3.5 Ottimizzazione dei parametri di ionizzazione in LC-ESI-MS/MS

Durante le analisi LC-ESI-MS/MS è stato necessario adattare parametri relativi alla sorgente di ionizzazione al flusso di fase mobile scelta (350 µL/min, contro i 50 µL/min utilizzati per la caratterizzazione delle molecole). Per garantire una ionizzazione ottimale a un flusso di 350 µL/min l'ESI è stata impostata con i seguenti parametri forniti dal produttore. I parametri impostati sono i seguenti:

***Tabella 3**: Parametri di ionizzazione ESI*

Curtain gas	35
Temperatura della sorgente	350 °C
Gas 1	40
Gas 2	50
***Declustering potential* (DP)**	0-100 V (specifico per ogni sostanza

6.4 Rette di calibrazione

La preparazione delle rette di calibrazione è stata eseguita per tutte le molecole in esame: Morfina, 6-Acetilmorfina, Codeina e Diidrocodeina. Per la costruzione dei punti della curva sono state impiegate le rispettive soluzioni madri, dalle quali sono state effettuate diluizioni successive per ottenere le soluzioni mix di lavoro. Al fine di uniformare le concentrazioni delle quattro sostanze, le soluzioni di 6-Acetilmorfina e Diidrocodeina, inizialmente a 1 mg/mL, sono state diluite 1:10 con metanolo (10 µL di soluzione madre + 90 µL di metanolo), ottenendo soluzioni alla stessa concentrazione delle soluzioni di Morfina e Codeina (0,1 mg/mL). Successivamente, sono stati preparati 4 mL di una soluzione mix a 1000 ng/mL prelevando 40 µL di ciascuna delle quattro soluzioni a 0,1 mg/mL e portando il volume a 4 mL con metanolo. Dalla soluzione mix alla concentrazione di 1000 ng/mL sono state successivamente preparate soluzioni alla concentrazione di 100 ng/mL e 10 ng/mL mediante diluizioni 1:10 e 1:100, rispettivamente.

Inoltre, sono state preparate soluzioni dello standard interno Morfina-D3 alle concentrazioni di 1000 ng/mL e 100 ng/mL. A partire dalla soluzione madre di Morfina-D3 alla concentrazione di 1 mg/mL è stata preparata una soluzione alla concentrazione di 0,1 mg/mL mediante diluizione 1:10 con metanolo. Successivamente, sono stati preparati 4 mL della soluzione alla concentrazione 1000 ng/mL prelevando 40 µL dalla soluzione a 0,1 ng/mL e portando il volume di 4 mL con 3960 µL di metanolo. Dalla soluzione alla concentrazione di 1000 ng/mL è stata infine effettuata una diluizione 1:10 con metanolo, ottenendo la soluzione alla concentrazione di 100 ng/mL.

Per la costruzione delle curve di calibrazione sono stati selezionati i seguenti punti:

- Bianco (50 µL di sangue + 500 µL tampone fosfato + 50 µL di standard interno);
- 5 ng/mL;
- 10 ng/mL;
- 50 ng/mL;
- 100 ng/mL;
- 250 ng/mL;
- 500 ng/mL;
- 1000 ng/mL

Il punto di calibrazione a 1000 ng/mL è stato ottenuto addizionando 500 µL della soluzione mix a 1000 ng/mL contenente morfina, 6-acetilmorfina, codeina e diidrocodeina. Dalla medesima soluzione mix sono stati inoltre prelevati 250 µL per ottenere il punto a 500 ng/mL e 125 µL per ottenere il punto a 250ng/mL. Partendo invece dalla soluzione mix alla concentrazione di 100 ng/mL sono stati ottenuti i punti di calibrazione a 100 ng/mL e 50 ng/mL addizionando rispettivamente 500 µL e 250 µL. Infine i punti a 10 ng/mL e 5 ng/mL sono stati ottenuti prelevando rispettivamente 500 µL e 250 µL dalla soluzione mix alla concentrazione di 10 ng/mL.

Per tutti i punti della retta di calibrazione sono stati aggiunti 50 µL della soluzione di standard interno morfina-D3 alla concentrazione di 100 ng/mL. La curva di calibrazione è stata costruita riportando sull'asse delle ascisse (X) le concentrazioni note di ciascun analita e sull'asse delle ordinate (Y) il rapporto tra l'area del picco dell'analita e quella dello standard interno. L'andamento della curva è descritto dall'equazione della retta di regressione lineare, accompagnata dal relativo coefficiente di correlazione (R^2), utilizzato come parametro di valutazione della linearità della risposta strumentale.

7. Sviluppo dei metodi

Trattandosi di metodi bioanalitici, lo sviluppo e l'ottimizzazione delle procedure sono stati condotti in conformità alle linee guida ICH M10 (87).

7.1 Studio di selettività

La selettività è definita come la capacità del metodo bioanalitico di misurare e differenziare inequivocabilmente gli analiti di interesse da altri componenti

eventualmente presenti nel campione, quali impurità, metaboliti, prodotti di degradazione o componenti della matrice. In ciascuna analisi è stato processato un campione di sangue "bianco" analogo al campione reale da analizzare ma privo degli analiti di interesse, seguendo le procedure descritte nei paragrafi precedenti. Il campione "bianco" è stato utilizzato per valutare l'eventuale presenza di segnali interferenti in corrispondenza dei tempi di ritenzione degli analiti e degli standard interni, al fine di verificare l'assenza di interferenze significative riconducibili alla matrice, ai reagenti o alla procedura analitica.

7.2 Sensibilità analitica

La sensibilità di un metodo analitico indica la sua capacità di rilevare la presenza di un analita anche a concentrazioni molto basse. Questo aspetto è misurato attraverso due parametri fondamentali: il limite di rilevabilità (LOD, Limit of Detection) e il limite di quantificazione (LOQ, Limit of Quantification). Il LOD è definito come la concentrazione minima di analita in grado di generare un segnale distinguibile dal rumore di fondo, generalmente associata a un rapporto segnale/rumore maggiore o uguale a 3 ($S/N \geq 3$), e rappresenta pertanto la più bassa concentrazione di analita che lo strumento è in grado di rivelare. Il LOQ rappresenta invece la concentrazione minima di analita che può essere determinata quantitativamente con un adeguato livello di accuratezza e precisione e viene generalmente associato a un rapporto segnale/rumore maggiore o uguale a 10 ($S/N \geq 10$). LOD e LOQ sono stati valutati analizzando campioni di sangue bianco addizionati con soluzioni standard contenenti opportune concentrazioni di ciascuna delle molecole oggetto di studio.

7.3 Linearità e variabilità del dato

La linearità è un parametro fondamentale per un'analisi quantitativa ed è stata valutata tramite curve di calibrazione costruite in base alla specifica procedura analitica adottata. La curva di calibrazione è stata realizzata su sette punti nell'intervallo compreso tra 5 ng/mL, corrispondente al LOQ, e 1000 ng/mL, intervallo considerato adeguato alla risposta strumentale. I dati ottenuti sono stati elaborati mediante regressione lineare, valutando la pendenza, l'intercetta e il coefficiente di determinazione (R^2). Ciascuna curva è stata considerata lineare qualora il valore di R^2 fosse risultato superiore a 0,99.

7.4 Accuratezza e Precisione

La riproducibilità della metodica è stata valutata sia in condizioni "intraday" sia "interday", ossia ciascun controllo di qualità (QC) è stato preparato in triplicato sia durante la stessa sequenza di analisi, sia in giorni differenti. Questa doppia modalità di valutazione è necessaria per assicurarsi che i risultati delle analisi effettuate non vengano alterati da eventi casuali verificatisi accidentalmente ed anche che essi non siano operatore-dipendenti. La riproducibilità viene studiata in termini di accuratezza e precisione. La precisone, espressa come coefficiente di variazione percentuale (CV%), rappresenta il grado di variabilità dei risultati ottenuti nelle diverse repliche analitiche ed è calcolata come rapporto tra la deviazione standard e la media matematica dei valori misurati, moltiplicando per 100. Si ritiene accettabile un valore di CV% non superiore al 15% per tutti i livelli di concentrazione, ad eccezione del LLOQ, per il quale è ammesso un limite del 20%. L'accuratezza, espressa come BIAS%, rappresenta la deviazione percentuale del valore misurato rispetto al valore nominale atteso. Essa corrisponde alla media dei valori di accuratezza calcolati per ciascun livello di controllo di qualità (QC) e per ogni analita. Secondo i criteri generalmente adottati per la validazione dei metodi bioanalitici, un metodo può essere considerato accurato se i valori medi di accuratezza per ciascun livello QC rientrano entro ±15% rispetto alla concentrazione nominale, mentre per il livello più basso (LLOQ QC) è ammessa una variazione massima di ±20%.

7.5 Effetto matrice e Recupero

Dal momento che la preparazione del campione prevede l'utilizzo di matrice ematica e successiva iniezione tramite sorgente ESI, un parametro molto importante da valutare durante uno studio è l'effetto matrice. È infatti noto che, la sorgente ESI sia molto sensibile alla presenza di possibili interferenti presenti nella matrice che, interferendo con la ionizzazione del campione, potrebbero dare origine fenomeni di ion suppression/enhancement.

L'effetto matrice descrive l'influenza esercitata dai componenti della matrice biologica sull'intensità del segnale dell'analita durante il processo di ionizzazione, potendo determinare una variazione della risposta strumentale rispetto a quella ottenuta in una soluzione priva di matrice.

$$MF\% = \frac{Area\ dell'analita\ in\ matrice\ post-estrazione}{Area\ dell'analita\ in\ soluzione\ pura} x100$$

L’effetto matrice è stato valutato sia per i campioni di sangue intero sia per i campioni DBS. A tale scopo, sono stati preparati tre campioni di acqua, ciascuno del volume di 50 µL, ai quali sono stati aggiunti gli analiti alle concentrazioni previste per la valutazione del parametro.

Per la preparazione dei campioni di riferimento per il sangue intero, a 50 µL di acqua sono stati aggiunti 500 µL di tampone fosfato a pH 6, 50 µL di standard interno e i volumi delle soluzioni standard necessari a ottenere i tre livelli di concentrazione considerati, corrispondenti a 10, 100 e 500 ng/mL.

Per la preparazione dei campioni di riferimento per i DBS, 50 µL di acqua sono stati depositati sulle apposite aree del cartoncino DBS. I campioni sono stati lasciati essiccare *overnight*, a temperatura ambiente, circa 25 °C, e al riparo dalla luce diretta. Successivamente, le aree contenenti il campione sono state ritagliate e trasferite all’interno di una provetta a fondo conico, nelle quali sono state effettuate le medesime aggiunte previste per i campioni di sangue intero.

Per tutti e tre i livelli di concentrazione sono state effettuate tre repliche, consentendo così di stimare l’influenza della matrice sul recupero e sulla risposta analitica.

Il recupero (*recovery*) rappresenta l’efficienza con cui un analita viene estratto dalla matrice biologica attraverso la procedura di preparazione del campione. Tale parametro consente di valutare la frazione dell’analita inizialmente presente nella matrice che viene effettivamente estratta e resa disponibile per la successiva analisi, tenendo conto delle fasi di estrazione e purificazione. Il recupero viene generalmente valutato confrontando la risposta analitica ottenuta da campioni sottoposti all’intera procedura di estrazione con quella di campioni post-estrazione, nei quali gli analiti vengono aggiunti alla matrice dopo il completamento della fase estrattiva. La percentuale di recupero viene quindi calcolata mediante la seguente formula:

$$Recupero\% = \frac{Area\ del\ campione\ estratto}{Area\ del\ campione\ post\ estrazione} x100$$

7.6 Effetto di trascinamento

L'effetto di trascinamento (*carry-over*) si verifica quando una frazione degli analiti presenti in un campione viene trattenuta dalle superfici o dai componenti del sistema cromatografico e successivamente rilasciata durante l'analisi dei campioni successivi.

Tale fenomeno può essere favorito dalle caratteristiche chimico-fisiche degli analiti e dalle loro interazioni con i diversi componenti del sistema e può determinare la comparsa di segnali residui nel cromatogramma del campione successivo, compromettendo la selettività del metodo e l'accuratezza della quantificazione.

L'effetto di trascinamento è stato pertanto valutato mediante l'iniezione di un campione bianco immediatamente successiva all'analisi del campione contenente gli analiti alla concentrazione massima della retta di calibrazione (1000 ng/mL).

7.7 Stabilità

La stabilità rappresenta la capacità dell'analita di mantenere le proprie caratteristiche chimiche e una risposta analitica adeguata nel tempo e nelle condizioni di conservazione e analisi previste dal metodo, senza variazioni tali da compromettere l'affidabilità della quantificazione.

Nel presente lavoro, la valutazione della stabilità è stata limitata alla stabilità in autosampler a 25 °C, con l'obiettivo di verificare l'assenza di degradazioni significative durante la permanenza dei campioni nel sistema analitico prima dell'iniezione. I controlli di qualità (QC) sono stati analizzati immediatamente dopo la preparazione e, nuovamente, dopo un determinato periodo di permanenza nell'autosampler. In accordo con le linee guida, la stabilità è considerata accettabile qualora la variazione della concentrazione misurata rientri entro ±15% rispetto al valore iniziale.

8. Risultati e discussione

8.1 Sviluppo e validazione metodo LC-MS/MS

La metodica è stata ottimizzata utilizzando 50 µL di matrice ematica, con l'obiettivo di sviluppare una procedura applicabile anche in condizioni di limitata disponibilità di campione.

8.1.1 Sensibilità analitica

L'analisi della sensibilità dei due metodi sviluppati ha evidenziato differenze significative nei limiti di rilevazione (LOD) e di quantificazione (LOQ) ottenuti per le molecole oggetto di studio. Per entrambe le metodiche sono stati ottenuti valori di LOQ inferiori a 5 ng/mL per tutte le molecole considerate, evidenziando una sensibilità analitica adeguata nell'intervallo di concentrazione studiato, a conferma dell'elevata sensibilità e dell'efficacia complessiva del procedimento analitico. Nella tabella sottostante sono riportati i valori di LOD e LOQ relativi a Morfina, 6-Acetilmorfina, Codeina e Diidrocodeina.

***Tabella 4**: Valori di LOD e LOQ calcolati per ciascuna molecola analizzata in LC MS/MS*

SANGUE	**LOD (ng/mL)**	**LOQ (ng/mL)**
Morfina	0,04	0,13
6-Acetilmorfina	0,08	0,27
Codeina	0,07	0,22
Diidrocodeina	0,08	0,28

***Tabella 5**: Valori di LOD e LOQ calcolati per ciascuna molecola analizzata in LC MS/MS*

DBS	**LOD (ng/mL)**	**LOQ (ng/mL)**
Morfina	0,07	0,22
6-Acetilmorfina	0,20	0,72
Codeina	0,17	0,56
Diidrocodeina	0,46	1,50

Di seguito sono riportati i cromatogrammi relativi al punto di calibrazione a 100 ng/mL per ciascuna delle molecole oggetto di studio, ottenuti mediante entrambi i metodi analitici. I cromatogrammi mostrano la risposta analitica ottenuta a seguito dell'ottimizzazione dei parametri strumentali e consentono di valutarne la capacità di rilevare e separare gli analiti nelle condizioni analitiche adottate.

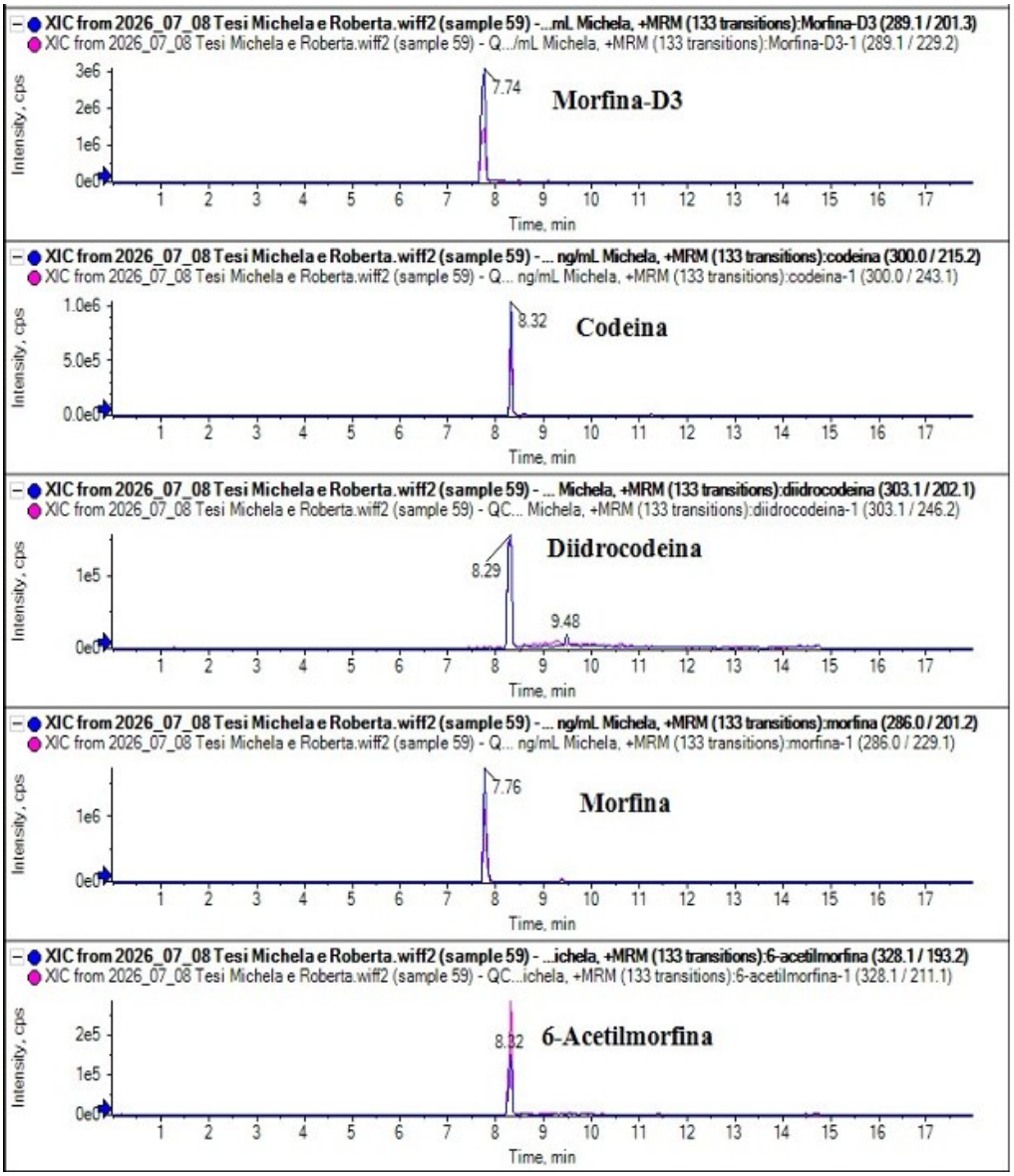


Figura 11*: Cromatogrammi rappresentanti i picchi cromatografici relativi alle sostanze in esame e allo standard interno di campioni di sangue intero*

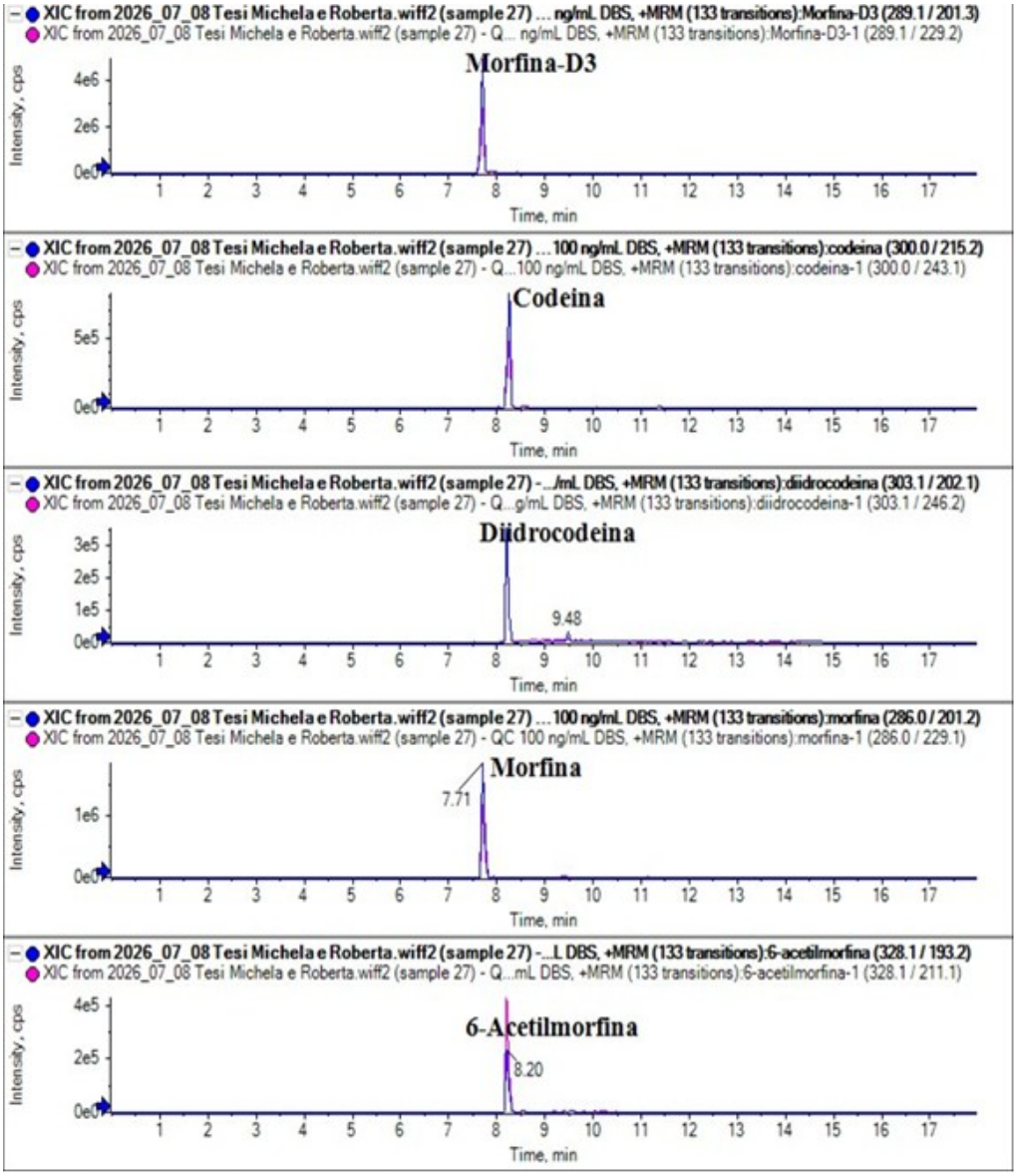


***Figura 12**:Cromatogrammi rappresentanti i picchi cromatografici relativi alle sostanze in esame e allo standard interno di campioni DBS*

8.1.2 Linearità, Accuratezza e Precisione

Le rette di calibrazione ottenute per entrambe le metodiche hanno mostrato una risposta lineare nell'intervallo di concentrazione studiato, con coefficienti di determinazione (R^2) superiori a 0,99 per tutti gli analiti.

A titolo esemplificativo, di seguito sono riportate le curve di calibrazione relative alle diverse sostanze per entrambi i metodi valutati.

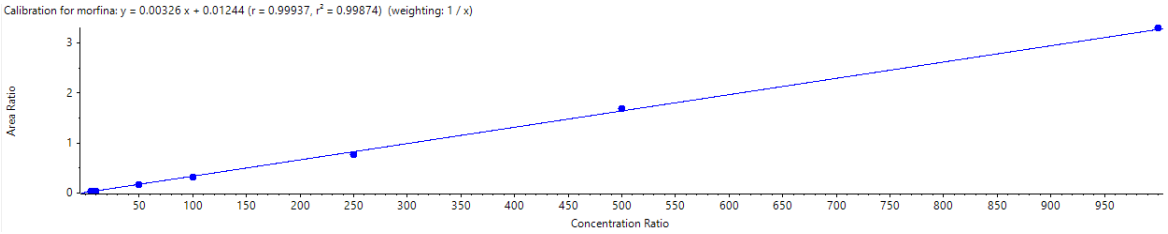


Figura 13: *Retta di calibrazione a 7 punti per la Morfina nel sangue intero*

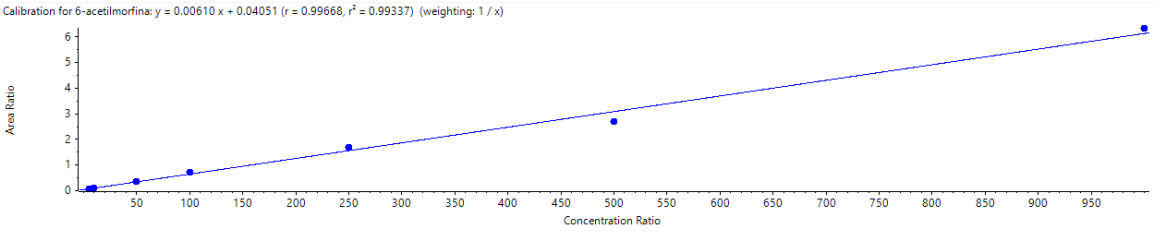


Figura 14: *Retta di calibrazione a 7 punti per la 6-Acetilmorfina nel sangue intero*

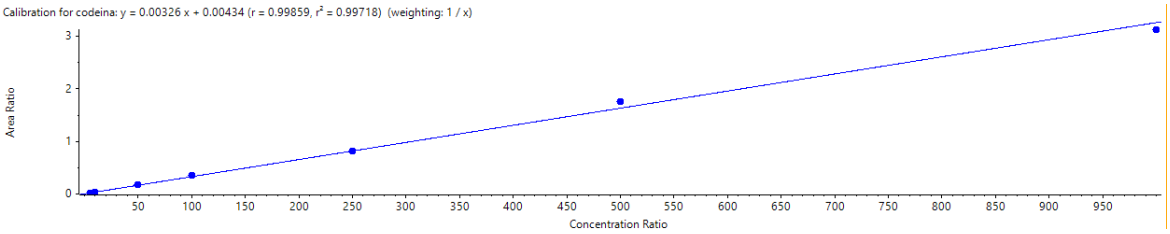


Figura 15: *Retta di calibrazione a 7 punti per la Codeina nel sangue intero*

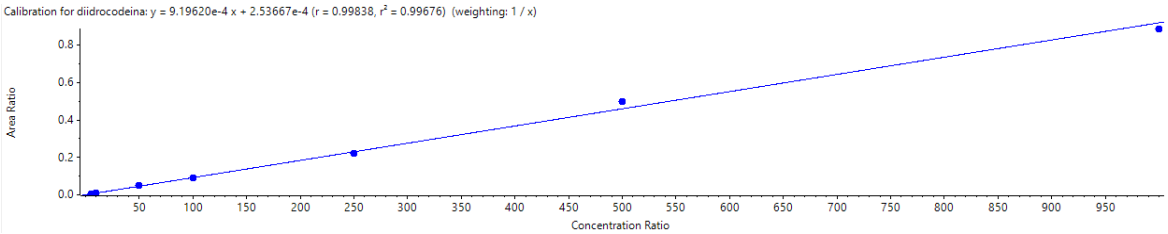


Figura 16: *Retta di calibrazione a 7 punti per la Diidrocodeina nel sangue intero*

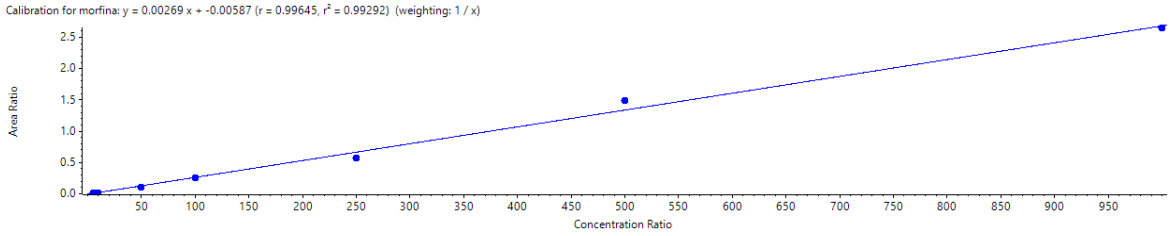


Figura 17: *Retta di calibrazione a 7 punti per la Morfina in DBS*

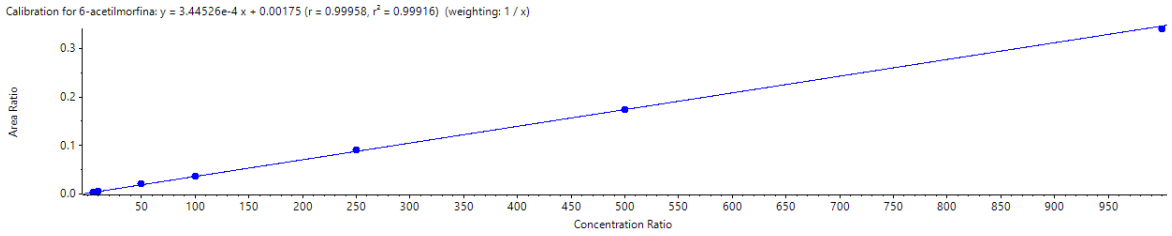


Figura 18: *Retta di calibrazione a 7 punti per la 6-Acetilmorfina in DBS*

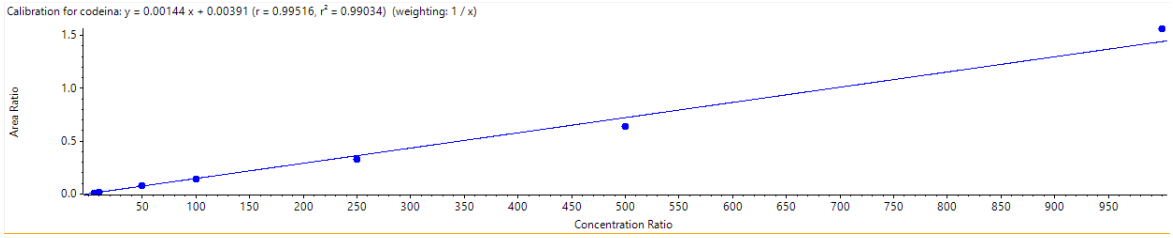


Figura 19: *Retta di calibrazione a 7 punti per la Codeina in DBS*

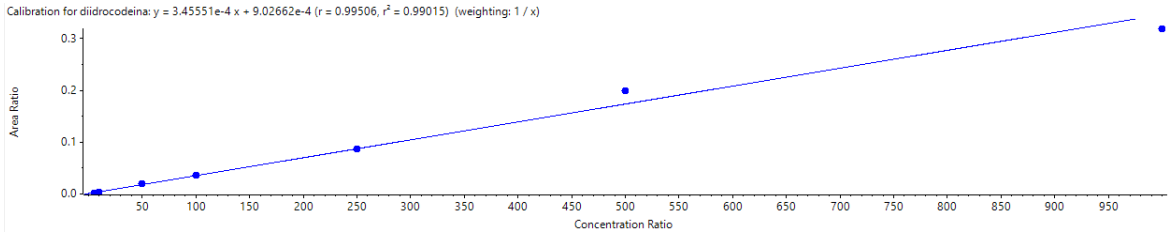


Figura 20: *Retta di calibrazione a 7 punti per la Diidrocodeina in DBS*

8.1.3 Riproducibilità

La ripetibilità intraday è stata valutata mediante l'analisi di tre replicati per ciascun livello di QC all'interno dello stesso batch. La ripetibilità interday, invece, è stata determinata mediante l'elaborazione di tre curve di calibrazione, ciascuna accompagnata dai relativi QC, ottenute in tre giornate analitiche differenti. Per entrambi i campioni (sangue intero e DBS) analizzati mediante la procedura di estrazione SPE, sono stati selezionati tre livelli di QC: 10 ng/mL (low QC), 100 ng/mL (mid) e 500 ng/mL (high QC). La scelta di utilizzare tre livelli di QC è motivata dal fatto che il metodo rappresenta un adattamento e un'ottimizzazione di una procedura già validata e utilizzata nell'ambito della routine

analitica. La validazione della metodologia originale ha pertanto consentito di adottare un numero ridotto di livelli di QC, senza compromettere un controllo adeguato delle prestazioni analitiche. Come riportato nella tabella seguente, i valori di BIAS% e CV%, misurati sia all'interno dello stesso batch sia tra sessioni analitiche eseguite in giorni differenti, rientrano pienamente nei criteri di accettazione di accuratezza e precisione intra- e interday.

***Tabella 6**: Accuratezza e Precisione del metodo per tutte le sostanze nei campioni di sangue intero*

QC 10 ng/ml	Accuratezza (BIAS%)		Precisione (CV%)	
	Intraday	**Interday**	**Intraday**	**Interday**
Morfina	100,7	93,7	89,0	88,8
6-Acetilmorfina	95,5	114,5	93,1	85,8
Codeina	92,9	101,0	93,1	86,4
Diidrocodeina	93,6	93,2	90,1	93,3

QC 100ng/ml	Accuratezza (BIAS %)		Precisione (CV%)	
	Intraday	**Interday**	**Intraday**	**Interday**
Morfina	101,3	98,7	93,4	88,0
6-Acetilmorfina	104,7	89,1	86,0	85,7
Codeina	99,6	109,5	90,4	89,6
Diidrocodeina	101,5	106,5	95,1	92,4

QC 500ng/ml	Accuratezza (BIAS %)		Precisione (CV%)	
	Intraday	**Interday**	**Intraday**	**Interday**
Morfina	108,8	108,1	87,3	90,7
6-Acetilmorfina	96,8	93,0	86,0	86,0
Codeina	106,6	104,0	89,8	91,6
Diidrocodeina	109,0	99,5	95,7	89,5

***Tabella** 7: Accuratezza e Precisione del metodo per tutte le sostanze nei campioni DBS*

QC 10 ng/mL	Accuratezza (BIAS %)		Precisione (CV%)	
	Intraday	**Interday**	**Intraday**	**Interday**
Morfina	114,1	99,0	91,8	97,9
6-Acetilmorfina	105,4	91,3	86,9	95,7
Codeina	102,5	113,9	92,2	87,6
Diidrocodeina	98,9	110,9	86,8	95,7

QC 100 ng/mL	Accuratezza (BIAS %)		Precisione (CV%)	
	Intraday	**Interday**	**Intraday**	**Interday**
Morfina	109,4	113,6	89,4	93,4
6-Acetilmorfina	108,3	105,3	95,2	97,2
Codeina	109,8	103,5	91,1	92,6
Diidrocodeina	103,6	103,6	87,2	90,1

QC 500 ng/mL	Accuratezza (BIAS %)		Precisione (CV%)	
	Intraday	**Interday**	**Intraday**	**Interday**
Morfina	110,4	98,1	93,8	86,7
6-Acetilmorfina	113,4	96,5	93,0	94,9
Codeina	96,2	95,2	91,8	97,7
Diidrocodeina	91,4	111,6	88,7	95,0

8.1.4 Effetto Matrice e Recupero

Per entrambi i campioni trattati, le valutazioni dell'effetto matrice e del recupero sono state condotte con il metodo SPE. I valori ottenuti per l'effetto matrice e il recupero risultano complessivamente compresi negli intervalli considerati accettabili per il metodo per le quattro sostanze in esame, sia su DBS, sia su sangue intero. In particolare, l'effetto matrice rientra pienamente nei limiti di accettabilità (100 ± 20%), evidenziando un lieve fenomeno di ion suppression per la molecola di morfina, a tutti e tre i livelli di

concentrazione, soprattutto per quanto riguarda il sangue intero. In generale questo fenomeno si evidenzia per tutte le molecole in studio se analizzate dopo apposizione su DBS. Ciò è coerente con il fatto che la sorgente di ionizzazione ESI è intrinsecamente più sensibile ai fenomeni di ion suppression e ion enhancement indotti dalla matrice.

***Tabella 8**: Effetto matrice dei campioni di sangue intero*

SANGUE	**Effetto Matrice (%)**		
	10 ng/mL	**100 ng/mL**	**500 ng/mL**
Morfina	90,6	89,7	85,3
6-Acetilmorfina	91,1	101,3	101,7
Codeina	89,6	114,4	94,7
Diidrocodeina	96,5	89,7	102,9

***Tabella 9**: Effetto matrice dei campion i DBS*

DBS	**Effetto Matrice (%)**		
	10 ng/mL	**100 ng/mL**	**500 ng/mL**
Morfina	99,3	86,8	93,9
6-Acetilmorfina	103,1	111,5	98,0
Codeina	86,9	105	96,6
Diidrocodeina	95,3	101,2	97,0

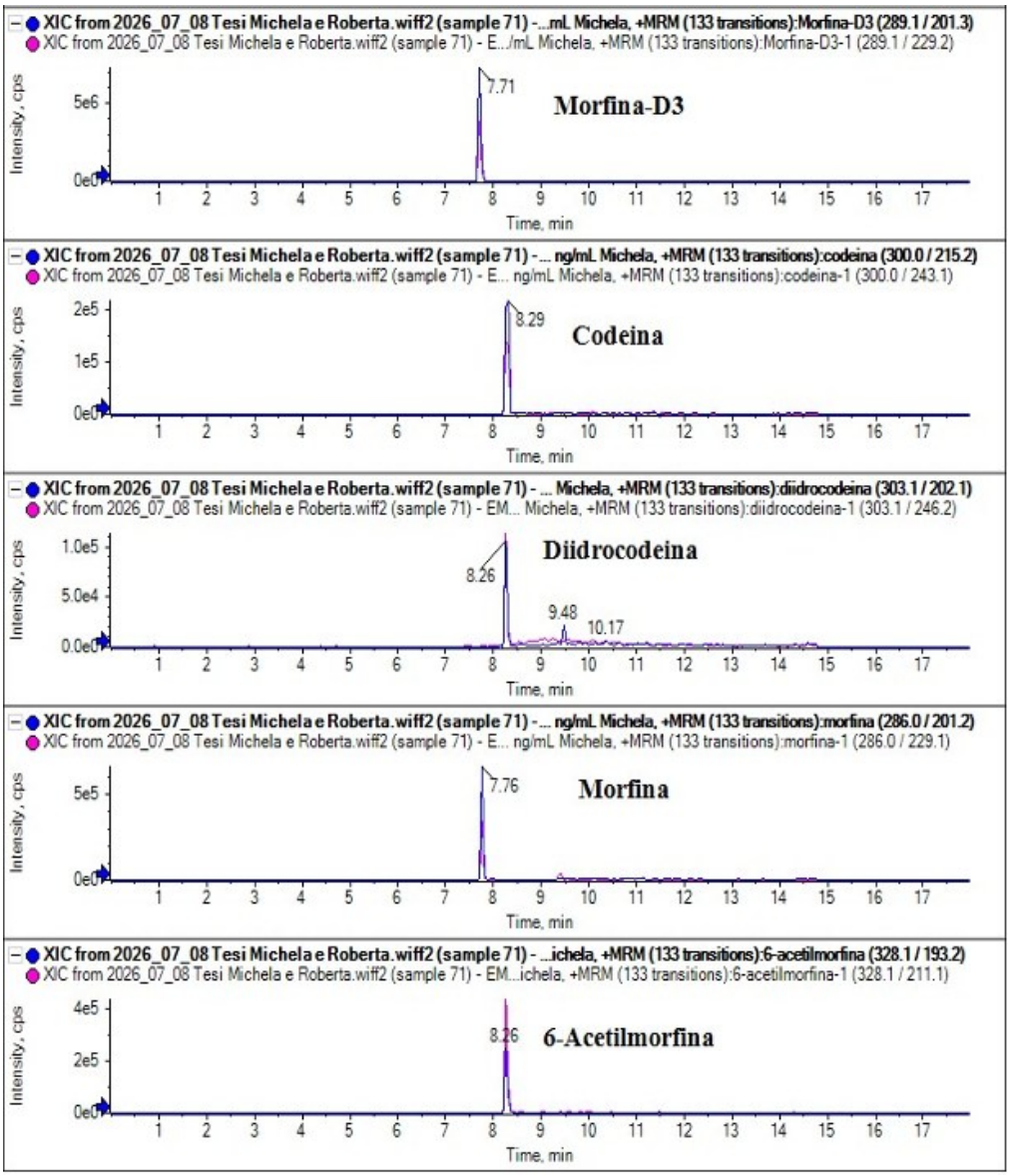


Figura 21: *Cromatogrammi relativi all'effetto matrice a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni di sangue*

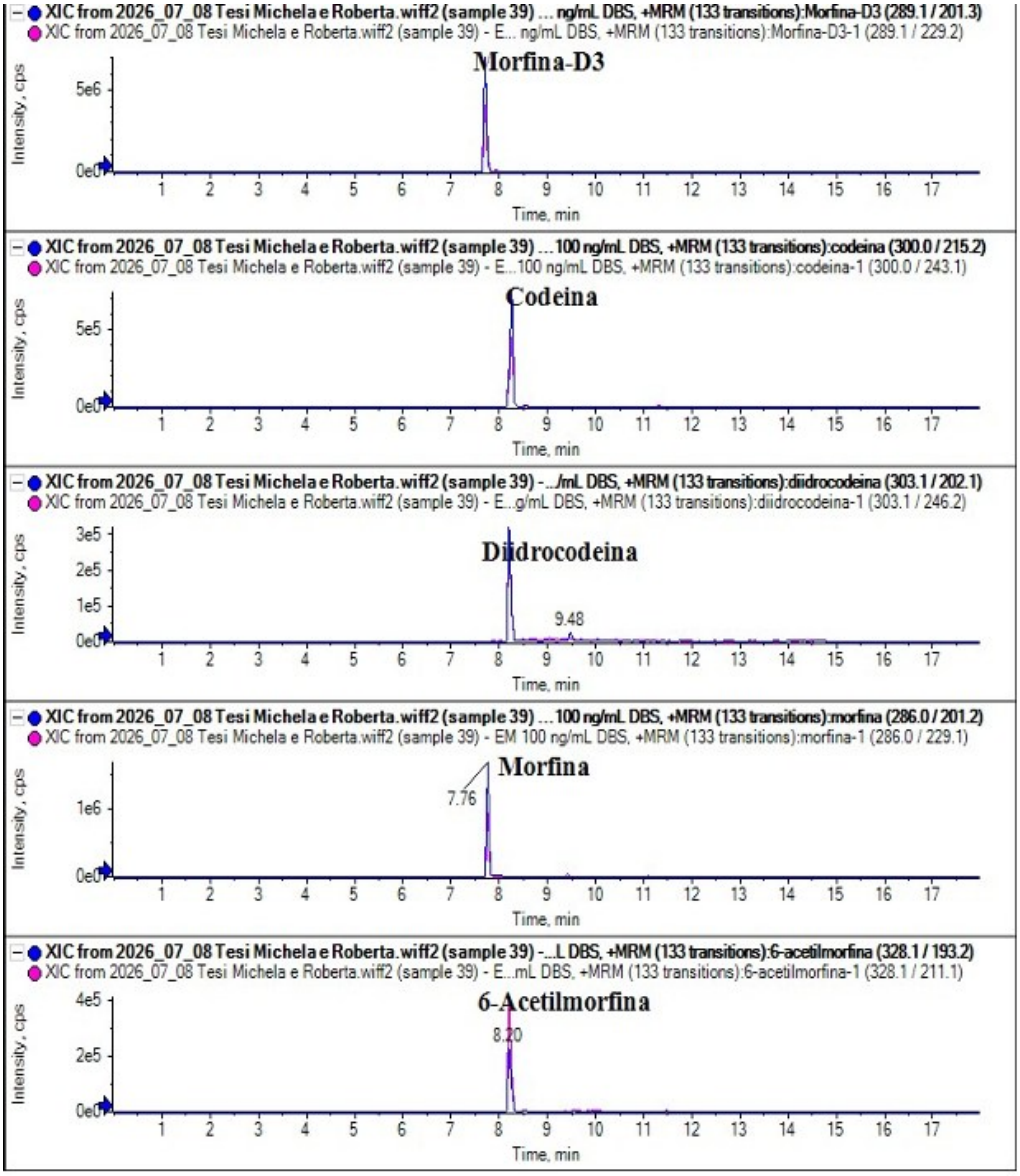


***Figura 22**: Cromatogrammi relativi all'effetto matrice a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni DBS*

Nel complesso, i valori di recupero indicano che le perdite di analita associate alla procedura estrattiva non risultano tali da compromettere la quantificazione nelle condizioni analitiche investigate.

***Tabella 10**: Recupero relativo ai campioni di sangue intero*

SANGUE	**Recupero (%)**		
	10 ng/mL	**100 ng/mL**	**500 ng/mL**
Morfina	112,1	111,8	118,5
6-Acetilmorfina	89,5	91,4	89,4
Codeina	85,9	114,1	101,9
Diidrocodeina	109,5	92,9	102,2

***Tabella 11**: Recupero relativo ai campioni DBS*

DBS	**Recupero (%)**		
	10 ng/mL	**100 ng/mL**	**500 ng/mL**
Morfina	106,1	112,1	108,6
6-Acetilmorfina	89,7	85,6	96,6
Codeina	101,8	95,9	96,1
Diidrocodeina	89,7	85,6	96,6

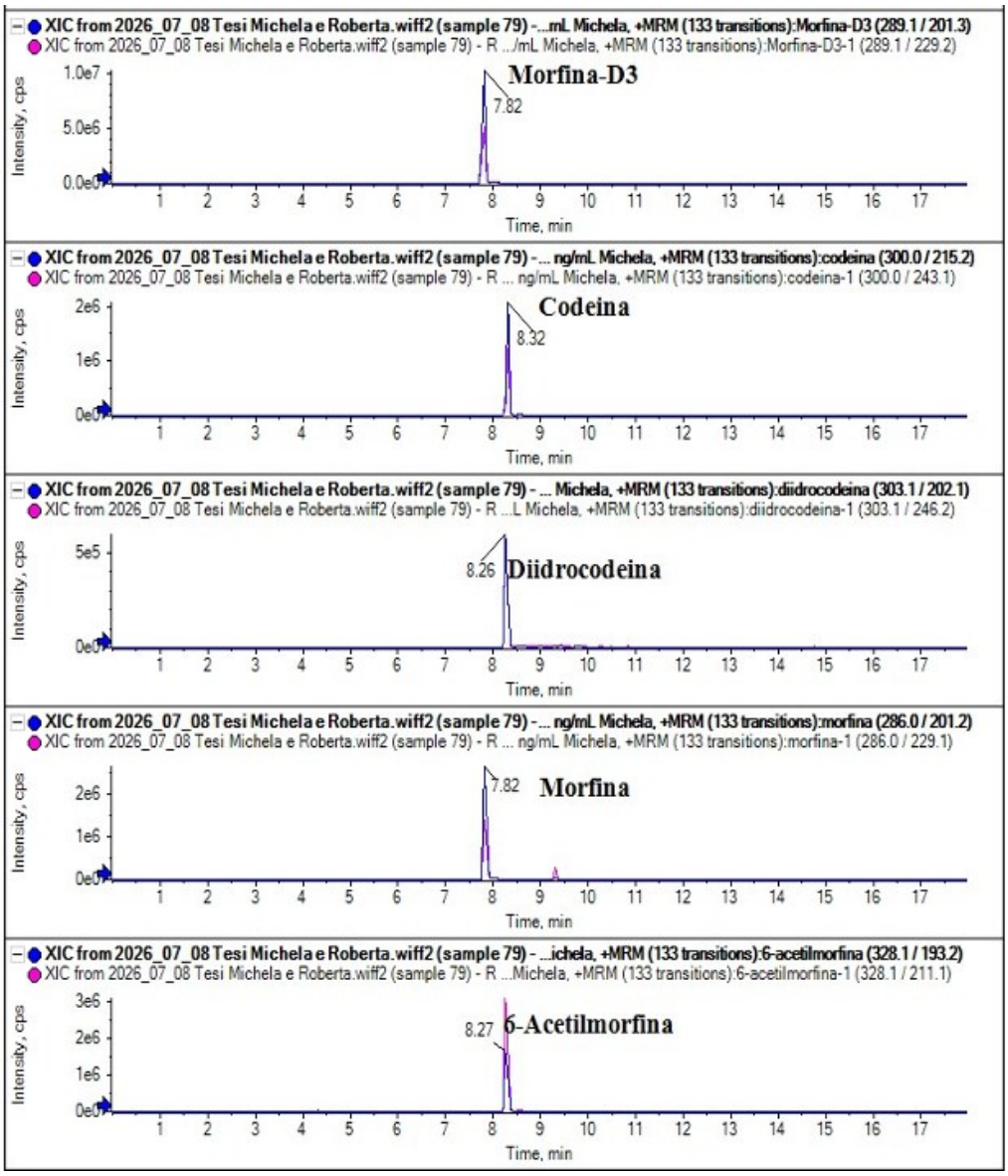


***Figura 23**: Cromatogrammi relativi al recupero a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni di sangue intero*

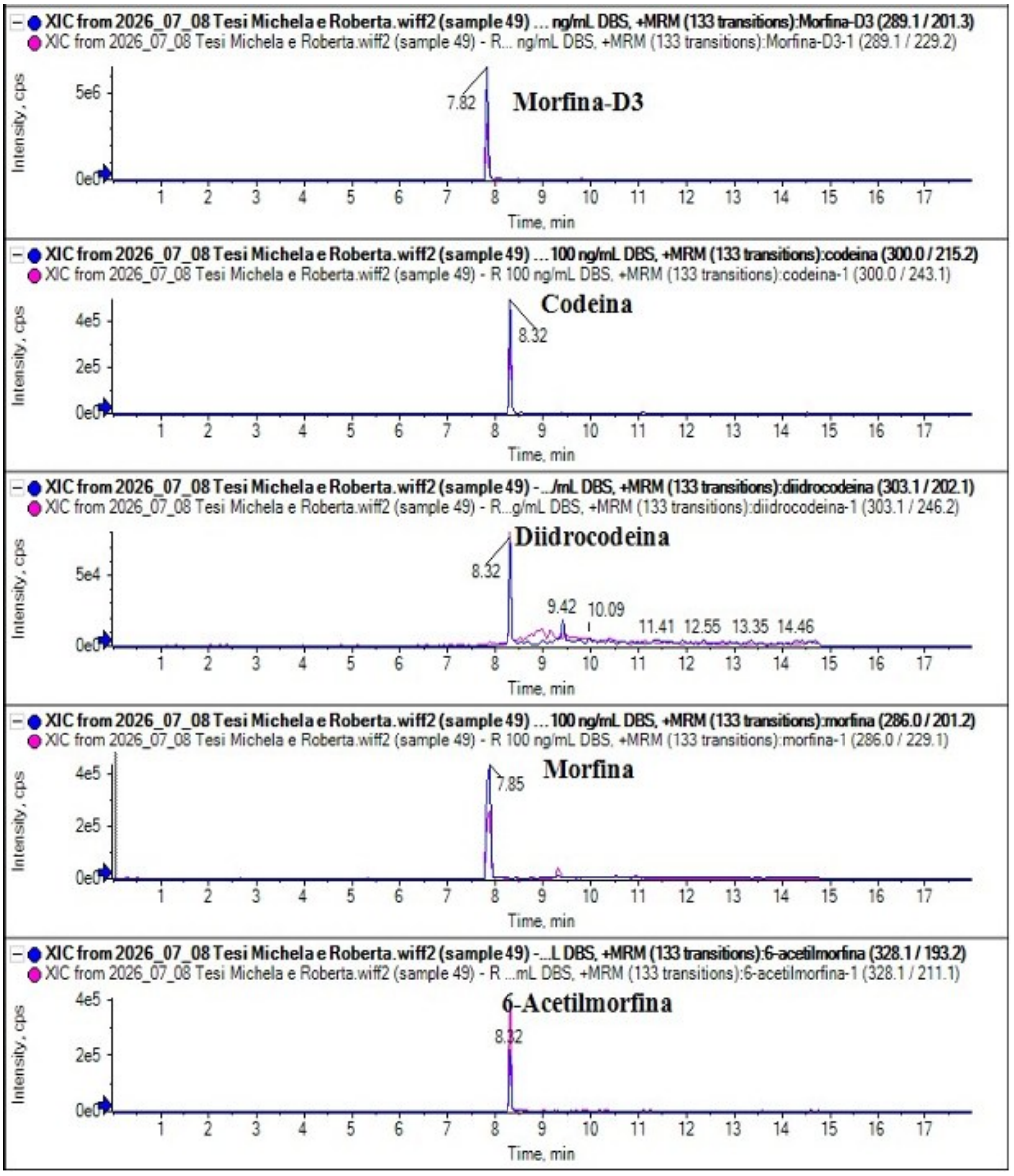


***Figura 24**: Cromatogrammi relativi al recupero a 100 ng/mL di ciascuna sostanza nei campioni DBS*

8.1.5 Effetto trascinamento

La valutazione dell'eventuale fenomeno di carry-over ha confermato l'assenza di effetti di trascinamento per tutti e quattro gli analiti considerati. In particolare, l'analisi dei campioni bianchi analizzati dopo l'iniezione del livello più elevato della curva di calibrazione (1000 ng/mL) non ha evidenziato alcun segnale attribuibile agli analiti, non evidenziando fenomeni di carry-over nelle condizioni sperimentali adottate.

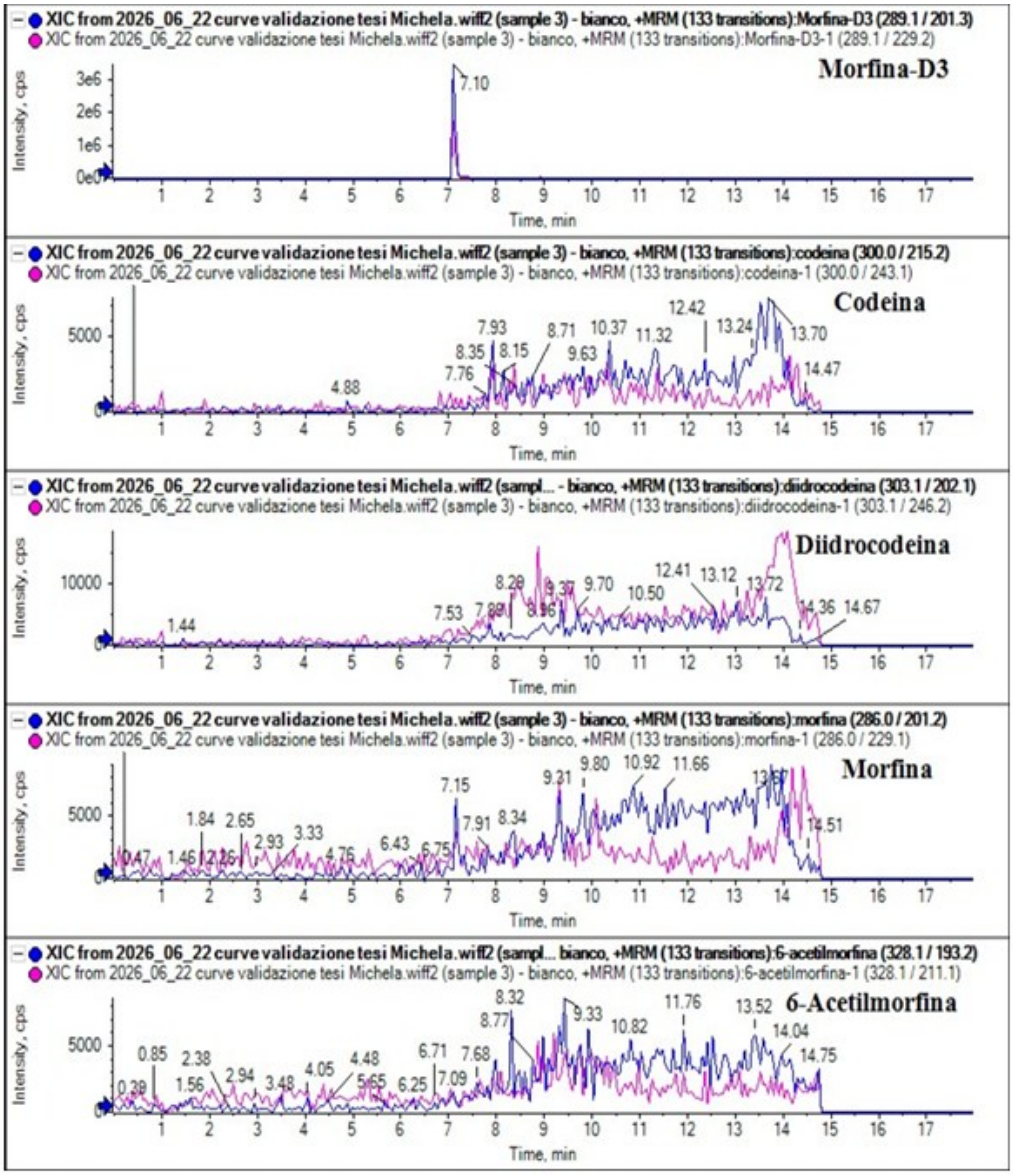


***Figura 25**: Campioni "bianchi" di sangue intero analizzati dopo il punto più alto della retta (1000 ng/mL)*

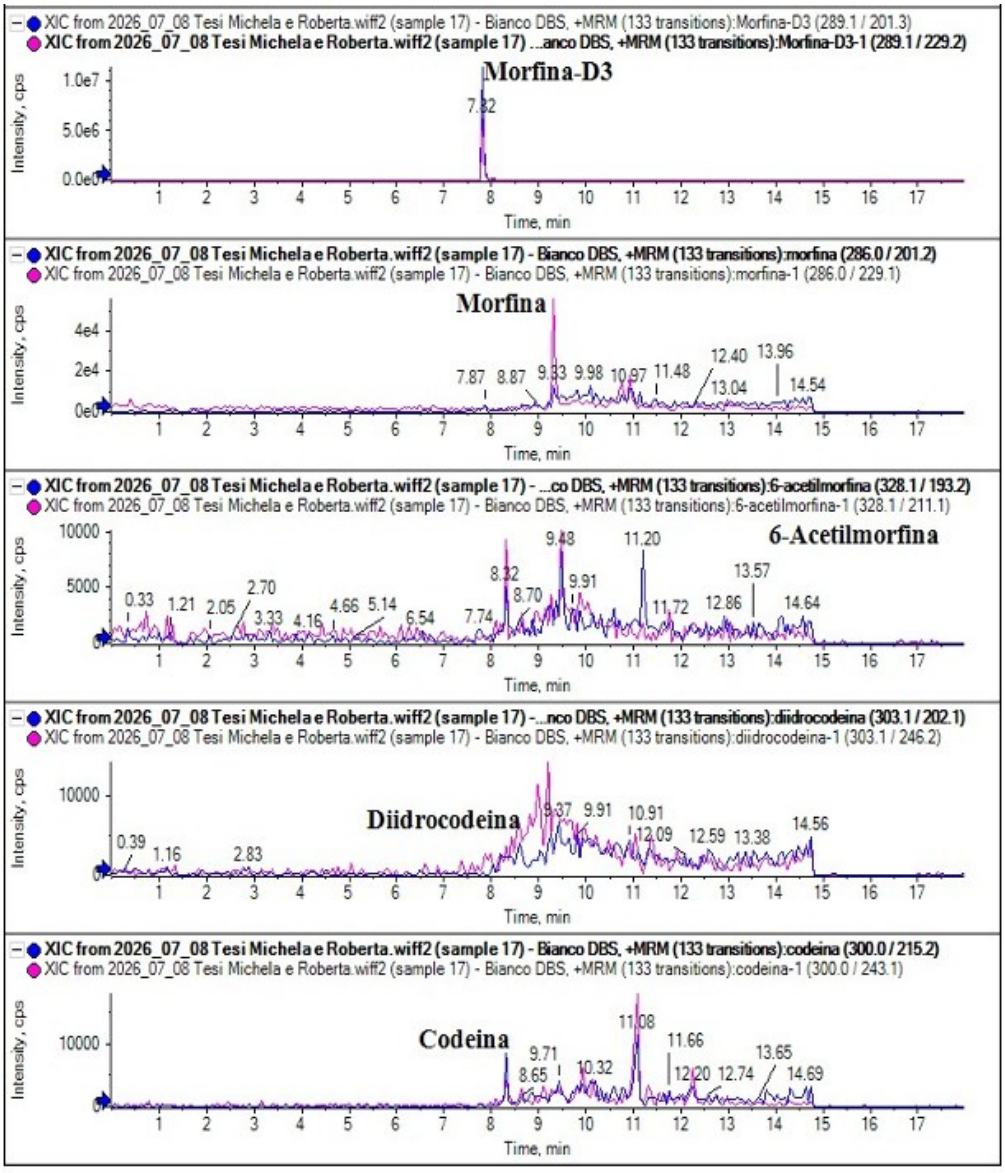


***Figura 26**: Campioni "bianchi" DBS analizzati dopo il punto più alto della retta (1000 ng/mL)*

9. Conclusioni

Nel complesso, i risultati ottenuti consentono di ritenere raggiunti gli obiettivi principali dello studio, relativi all'ottimizzazione e alla valutazione delle prestazioni analitiche della metodica. In particolare, a seguito di tutti i risultati presentati e discussi nella sezione specifica, è possibile trarre le seguenti conclusioni:

È stata messa a punto una metodica analitica ottimizzata e adattata su sistema LC-MS/MS per l'identificazione e la determinazione quantitativa morfina, 6-acetilmorfina, codeina e diidrocodeina in campioni di sangue intero e DBS. La metodica ha mostrato prestazioni analitiche complessivamente adeguate in termini di sensibilità, linearità, accuratezza, precisione, selettività ed effetto matrice, sulla base dei parametri valutati. In particolare, la metodica ha garantito al laboratorio pavese di poter ricercare e identificare queste molecole anche tramite l'utilizzo di un volume esiguo di campione (50 µL), consentendo di disporre di una procedura potenzialmente applicabile, in successive fasi di studio, all'analisi di campioni reali che, visto lo scarso volume, non hanno permesso un'analisi adeguata.

Infine, lo studio ha permesso di considerare l'utilizzo di un nuovo tipo di colonna cromatografica risultando in un miglioramento della ritenzione e del peak shape di queste molecole che non risultava possibile con la colonna precedentemente in uso presso il laboratorio, così da ampliare il pool di analisi effettuabili.

L'impiego della matrice DBS presenta un potenziale interesse in ambito tossicologico-forense, in particolare nei contesti caratterizzati dalla necessità di utilizzare piccoli volumi di sangue e di semplificare le procedure di raccolta e conservazione.

Un limite del presente studio è rappresentato dall'assenza di campioni reali positivi per gli analiti di interesse; pertanto, l'applicabilità della metodica a campioni biologici reali dovrà essere ulteriormente verificata in studi successivi.

Bibliografia

1. Devereaux AL, Mercer SL, Cunningham CW. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Morphine. ACS Chem Neurosci. 2018 Oct 17;9(10):2395–407. doi:10.1021/acschemneuro.8b00150 PubMed PMID: 29757600.

2. Wicks C, Hudlicky T, Rinner U. Morphine alkaloids: History, biology, and synthesis. Alkaloids: Chemistry and Biology. 2021 Jan 1;86:145–342. doi:10.1016/bs.alkal.2021.04.001 PubMed PMID: 34565506.

3. National Center for Biotechnology Information. PubChem [Internet]. 2026 [cited 2026 Aug 5]. PubChem Compound Summary for CID 5288826, Morphine. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Morphine

4. Ofoegbu A, B. Ettienne E. Pharmacogenomics and Morphine. Journal of Clinical Pharmacology. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 1149–55. doi:10.1002/jcph.1873 PubMed PMID: 33847389.

5. Wang S. Historical Review: Opiate Addiction and Opioid Receptors. Cell Transplant. 2018 Mar 1;28(3):233. doi:10.1177/0963689718811060 PubMed PMID: 30419763.

6. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. Anesthesiology. 2011. p. 1363–81. doi:10.1097/ALN.0b013e318238bba6 PubMed PMID: 22020140.

7. Dang VC, Christie MJ. Mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons. Br J Pharmacol. 2012 Mar;165(6):1704. doi:10.1111/J.1476-5381.2011.01482.X PubMed PMID: 21564086.

8. Coates S, Lazarus P. Hydrocodone, Oxycodone, and Morphine Metabolism and Drug–Drug Interactions. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy (ASPET); 2023. p. 150–69. doi:10.1124/jpet.123.001651 PubMed PMID: 37679047.

9. De Gregori S, De Gregori M, Ranzani GN, Allegri M, Minella C, Regazzi M. Morphine metabolism, transport and Brain disposition. Metabolic Brain Disease. 2012. p. 1–5. doi:10.1007/s11011-011-9274-6 PubMed PMID: 22193538.

10. Taylor K, Elliott S. A validated hybrid quadrupole linear ion-trap LC-MS method for the analysis of morphine and morphine glucuronides applied to opiate deaths. Forensic Sci Int. 2009 May 30;187(1–3):34–41. doi:10.1016/j.forsciint.2009.02.011 PubMed PMID: 19297106.

11. Skopp G, Pijtsch L, Gangmann B, Aderjan R, Mattern R. A Preliminary Study on the Distribution of Morphine and Its Glucuronides in the Subcompartments of Blood. Journal of Analytical Toxicology [Internet]. Available from: https://academic.oup.com/jat/article/22/4/261/715111

12. Pastrana T, De Lima L, Dudgeon D, Voeuk A, Ahmed E, Radbruch L. Use of Essential Medicines for Pain Relief and Palliative Care: A Global Consensus Process. J Pain Symptom Manage. 2025 Jan 1;69(1):53–64. doi:10.1016/J.JPAINSYMMAN.2024.10.024 PubMed PMID: 39486693.

13. The selection and use of essential medicines, 2025: WHO Model List of Essential Medicines, 24th list [Internet]. [cited 2026 Jul 25]. Available from: https://www.who.int/publications/i/item/B09474?utm_source=chatgpt.com

14. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. Anesthesiology. 2011 Dec;115(6):1363–81. doi:10.1097/ALN.0B013E318238BBA6 PubMed PMID: 22020140.

15. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. Anesthesiology. 2011. p. 1363–81. doi:10.1097/ALN.0b013e318238bba6 PubMed PMID: 22020140.

16. Volkow ND, Blanco C. Substance use disorders: a comprehensive update of classification, epidemiology, neurobiology, clinical aspects, treatment and prevention. World Psychiatry. 2023 Jun 1;22(2):203–29. doi:10.1002/wps.21073

17. National Center for Biotechnology Information. PubChem [Internet]. 2026 [cited 2026 Jul 20]. PubChem Compound Summary for CID 5462507, 6-

Acetylmorphine. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5462507

18. Milella MS, D'Ottavio G, De Pirro S, Barra M, Caprioli D, Badiani A. Heroin and its metabolites: relevance to heroin use disorder. Translational Psychiatry. Springer Nature; 2023. doi:10.1038/s41398-023-02406-5 PubMed PMID: 37031205.

19. Ellis AD, McGwin G, Davis GG, Dye DW. Identifying cases of heroin toxicity where 6-acetylmorphine (6-AM) is not detected by toxicological analyses. Forensic Sci Med Pathol. 2016 Sep 1;12(3):243–7. doi:10.1007/s12024-016-9780-2 PubMed PMID: 27114260.

20. Gottås A, Boix F, Oiestad EL, Vindenes V, Morland J. Role of 6-monoacetylmorphine in the acute release of striatal dopamine induced by intravenous heroin. International Journal of Neuropsychopharmacology. 2014;17(9):1357–65. doi:10.1017/S1461145714000169 PubMed PMID: 24576415.

21. Selleya E. Dana. 1-s2.0-S000629520100689X-main 1. 2001. doi:10.1016/S0006-2952(01)00689-X

22. Perekopskiy D, Kiyatkin EA. 6-Monoacetylmorphine (6-MAM), Not Morphine, Is Responsible for the Rapid Neural Effects Induced by Intravenous Heroin. ACS Chem Neurosci. 2019 Aug 21;10(8):3409–14. doi:10.1021/acschemneuro.9b00305 PubMed PMID: 31268284.

23. Avvisati R, Bogen IL, Andersen JM, Vindenes V, Mørland J, Badiani A, et al. The active heroin metabolite 6-acetylmorphine has robust reinforcing effects as assessed by self-administration in the rat. Neuropharmacology. 2019 May 15;150:192–9. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.12.023 PubMed PMID: 30578794.

24. Rook EJ, Huitema ADR, Van Den Brink W, Van Ree JM, Beijnen JH. Pharmacokinetics and Pharmacokinetic Variability of Heroin and its Metabolites: Review of the Literature. Current Clinical Pharmacology. 2006.

25. Rook EJ, Huitema ADR, Van Den Brink W, Van Ree JM, Beijnen JH. Population Pharmacokinetics of Heroin and its Major Metabolites. Clin Pharmacokinet. 2006.

26. Skoppl G, Ganssmann B, Cone EJ, Aderjan R. Plasma Concentrations of Heroin and Morphine-Related Metabolites after Intranasal and Intramuscular Administration. Journal of Analytical Toxicology [Internet]. Available from: https://academic.oup.com/jat/article/21/2/105/684074

27. National Center for Biotechnology Information. PubChem [Internet]. 2026 [cited 2026 Aug 1]. PubChem Compound Summary for CID 5284371, Codeine. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Codeine

28. Paladini A, Barrientos Penaloza J, Plancarte Sanchez R, Ergönenç T, Varrassi G. Bridging Old and New in Pain Medicine: An Historical Review. Cureus. 2023 Aug 17. doi:10.7759/cureus.43639

29. Pratiwi R, Noviana E, Fauziati R, Carrão DB, Gandhi FA, Majid MA, et al. A review of analytical methods for codeine determination. Molecules. 2021;26(4). doi:10.3390/MOLECULES26040800 PubMed PMID: 33557168.

30. Bach-Rojecky Iveta Merc L, Ana Soldo Anja Kos Petrak Ana Bučan ep. Resolving Issues About Efficacy and Safety of Low-Dose Codeine in Combination Analgesic Drugs: A Systematic Review [Internet]. doi:10.6084/m9.figshare.11925480

31. Dean L, Kane M. Codeine Therapy and CYP2D6 Genotype [Internet]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/

32. Zarin MKZ, Dehaen W, Salehi P, Asl AAB. Synthesis and Modification of Morphine and Codeine, Leading to Diverse Libraries with Improved Pain Relief Properties. Pharmaceutics. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023. doi:10.3390/pharmaceutics15061779

33. Mazák K, Noszál B, Hosztafi S. Advances in the Physicochemical Profiling of Opioid Compounds of Therapeutic Interest. ChemistryOpen. Wiley-VCH Verlag; 2019. p. 879–87. doi:10.1002/open.201900115

34. Thompson CM, Wojno H, Greiner E, May EL, Rice KC, Selley DE. Activation of G-Proteins by Morphine and Codeine Congeners: Insights to the Relevance of O- and N-Demethylated Metabolites at μ- and δ-Opioid Receptors. Journal of

Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2004 Feb;308(2):547–54. doi:10.1124/jpet.103.058602 PubMed PMID: 14600248.

35. Nikolaev VO, Boettcher C, Dees C, Bünemann M, Lohse MJ, Zenk MH. Live cell monitoring of μ-opioid receptor-mediated G-protein activation reveals strong biological activity of close morphine biosynthetic precursors. Journal of Biological Chemistry. 2007 Sep 14;282(37):27126–32. doi:10.1074/jbc.M703272200 PubMed PMID: 17616524.

36. Sindrup SH, Arendt-Nielsen L, Brosen K, Bj Erring P, Angelo HR, Eriksen B, et al. The effect of quinidine on the analgesic effect of codeine. Eur J Clin Pharmacol. 1992.

37. Poulsen L, Brøsen · K, Arendt-Nielsen · L, Gram LF, Elbaek K, Sindrup · S H. PHARMACOKINETICS AND DISPOSITION Codeine and morphine in extensive and poor metabolizers of sparteine: pharmacokinetics, analgesic effect and side effects. Eur J Clin Pharmacol. 1996.

38. Hasselstroè J, Yue QY, Saè J. PHARMACOK INETICS AND DISPOSITION The effect of codeine on gastrointestinal transit in extensive and poor metabolisers of debrisoquine.

39. Findlay JW BRWR. Codeine kinetics as determined by radioimmunoassay. 1977 Oct.

40. Dahan A, Wolk O, Zur M, Amidon GL, Abrahamsson B, Cristofoletti R, et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: Codeine phosphate. J Pharm Sci. 2014;103(6):1592–600. doi:10.1002/jps.23977 PubMed PMID: 24788239.

41. Vree TB V van WC. Pharmacokinetics and metabolism of codeine in humans. 1992.

42. Yue QY, Hasselstrom J, Svensson J 0, Sawe J. Pharmacokinetics of codeine and its metabolites in Caucasian healthy volunteers: comparisons between extensive and poor hydroxylators of debrisoquine. J. clin. Pharmac. 1991.

43. Yue QY, Säwe · J. PHARMACOK INETICS AND DISPOSITION Different effects of inhibitors on the O-and N-demethylation of codeine in human liver microsomes.

44. Kirchheiner J, Schmidt H, Tzvetkov M, Keulen JT, Lötsch J, Roots I, et al. Pharmacokinetics of codeine and its metabolite morphine in ultra-rapid metabolizers due to CYP2D6 duplication. Pharmacogenomics Journal. 2007 Aug;7(4):257–65. doi:10.1038/sj.tpj.6500406 PubMed PMID: 16819548.

45. Berg-Pedersen RM, Ripel Å, Karinen R, Vevelstad M, Bachs L, Vindenes V. Codeine to morphine concentration ratios in samples from living subjects and autopsy cases after incubation. J Anal Toxicol. 2014 Mar;38(2):99–105. doi:10.1093/jat/bkt099 PubMed PMID: 24324229.

46. Maas A, Madea B, Hess C. Confirmation of recent heroin abuse: Accepting the challenge. Drug Testing and Analysis. John Wiley and Sons Ltd; 2018. p. 54–71. doi:10.1002/dta.2244 PubMed PMID: 28681463.

47. Bach-Rojecky Iveta Merc L, Ana Soldo Anja Kos Petrak Ana Bučan ep. Resolving Issues About Efficacy and Safety of Low-Dose Codeine in Combination Analgesic Drugs: A Systematic Review [Internet]. doi:10.6084/m9.figshare.11925480

48. Van Hout MC, Norman I. Misuse of non-prescription codeine containing products: Recommendations for detection and reduction of risk in community pharmacies. International Journal of Drug Policy. Elsevier B.V.; 2016. p. 17–22. doi:10.1016/j.drugpo.2015.09.007 PubMed PMID: 26454626.

49. Taktak F, Bulduk I. Microwave-Assisted Hydrogenation of Codeine in Aqueous Media. ISRN Org Chem. 2012 Oct 17;2012:1–4. doi:10.5402/2012/104975

50. Leppert W, Woroń J. Dihydrocodeine: Safety concerns. Expert Review of Clinical Pharmacology. Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 9–12. doi:10.1586/17512433.2016.1092871 PubMed PMID: 26479786.

51. National Center for Biotechnology Information. PubChem [Internet]. 2026 [cited 2026 Aug 2]. PubChem Compound Summary for CID 5284543, Dihydrocodeine. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dihydrocodeine

52. Sobczak Ł, Gorynski K. Pharmacological aspects of over-the-counter opioid drugs misuse. Molecules. MDPI AG; 2020. doi:10.3390/molecules25173905 PubMed PMID: 32867117.

53. Schmidt H, Vormfelde S V., Klinder K, Gundert-Remy U, Gleiter CH, Skopp G, et al. Affinities of dihydrocodeine and its metabolites to opioid receptors. Pharmacol Toxicol. 2002 Aug;91(2):57–63. doi:10.1034/j.1600-0773.2002.910203.x PubMed PMID: 12420793.

54. Webb JA, Rostami-Hodjegan A, Abdul-Manap R, Hofmann U, Mikus G, Kamali F. Contribution of dihydrocodeine and dihydromorphine to analgesia following dihydrocodeine administration in man: a PK±PD modelling analysis.

55. Rowell FJ, Seymour RA, Rawlins MD. European Journal of Clinical Pharmacology Pharmacokinetics of Intravenous and Oral Dihydrocodeine and its Acid Metabolites. Eur J Clin Pharmacol. 1983.

56. Kirkwood LC, Nation RL, Somogyi AA. Characterization of the human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of dihydrocodeine binding affinity and potency to morphine [3, 4] and 100. Br J Clin Pharmacol. 1997.

57. Hufschmid E, Theurillat R, Martin U, Thormann W. Exploration of the metabolism of dihydrocodeine via determination of its metabolites in human urine using micellar electrokinetic capillary chromatography. Journal of Chromatography B. 1995.

58. Ammon S, Hofmann U, Griese EU, Gugeler N, Mikus G. Pharmacokinetics of dihydrocodeine and its active metabolite after single and multiple oral dosing. 1999.

59. Mahadevarao Premnath S SPKB. Physiology, Blood Plasma. 2026.

60. Biagiotti S, Pirla E, Magnani M. Drug transport by red blood cells. Frontiers in Physiology. Frontiers Media SA; 2023. doi:10.3389/fphys.2023.1308632

61. Humphry E, Armstrong CE. Physiology of red and white blood cells. Anaesthesia and Intensive Care Medicine. Elsevier Ltd; 2022. p. 118–22. doi:10.1016/j.mpaic.2021.10.019

62. Mamada H, Iwamoto K, Nomura Y, Uesawa Y. Predicting blood-to-plasma concentration ratios of drugs from chemical structures and volumes of distribution in humans. Mol Divers. 2021 Aug 1;25(3):1261–70. doi:10.1007/s11030-021-10186-7 PubMed PMID: 33569705.

63. Greco V, Giuffrida A, Locatelli M, Savini F, de Grazia U, Ciriolo L, et al. Emerging Trends in Pharmacotoxicological and Forensic Sample Treatment Procedures. Applied Sciences (Switzerland). MDPI; 2023. doi:10.3390/app13052836

64. de Campos EG, da Costa BRB, dos Santos FS, Monedeiro F, Alves MNR, Santos Junior WJR, et al. Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. Forensic Toxicology. Springer Japan; 2022. doi:10.1007/s11419-021-00596-5 PubMed PMID: 36454488.

65. Rosendo LM, Gonçalves R, Martins R, Castro V, Rosado T, Barroso M, et al. Dried Matrix Spots for the Determination of Opiates and Opioids: Methodological Advances and Applications. Molecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2025. doi:10.3390/molecules30183695 PubMed PMID: 41011587.

66. Dinis-Oliveira RJ, Vieira DN, Magalhãaes T. Guidelines for collection of biological samples for clinical and forensic toxicological analysis. Forensic Sci Res. 2016;1(1):42–51. doi:10.1080/20961790.2016.1271098

67. Flanagan RJ, Connally G, Evans JM. Analytical Toxicology. Toxicol Rev. 2005;24(1):63–71. doi:10.2165/00139709-200524010-00005

68. Abdelaal GMM, Hegazy NI, Etewa RL, Elmesallamy GEA. Postmortem redistribution of drugs: a literature review. Forensic Science, Medicine, and Pathology. Springer; 2024. p. 1483–90. doi:10.1007/s12024-023-00709-z PubMed PMID: 37715933.

69. Zilg B, Thelander G, Giebe B, Druid H. Postmortem blood sampling—Comparison of drug concentrations at different sample sites. Forensic Sci Int. 2017 Sep 1;278:296–303. doi:10.1016/j.forsciint.2017.07.006 PubMed PMID: 28800548.

70. Lemaire E, Schmidt C, Dubois N, Denooz R, Charlier C, Boxho P. Site-, Technique-, and Time-Related Aspects of the Postmortem Redistribution of Diazepam, Methadone, Morphine, and their Metabolites: Interest of Popliteal Vein Blood Sampling. J Forensic Sci. 2017 Nov 1;62(6):1559–74. doi:10.1111/1556-4029.13404 PubMed PMID: 28105644.

71. Niemiec A. Dried blood spot in toxicology: Current knowledge. Separations. MDPI; 2021. doi:10.3390/separations8090145

72. Moretti M, Manfredi A, Freni F, Previderé C, Osculati AMM, Grignani P, et al. A comparison between two different dried blood substrates in determination of psychoactive substances in postmortem samples. Forensic Toxicol. 2021 Jul 1;39(2):385–93. doi:10.1007/s11419-020-00567-2

73. Daousani C, Karalis V, Loukas YL, Schulpis KH, Alexiou K, Dotsikas Y. Dried Blood Spots in Neonatal Studies: A Computational Analysis for the Role of the Hematocrit Effect. Pharmaceuticals. 2023 Aug 1;16(8). doi:10.3390/ph16081126 PubMed PMID: 37631041.

74. Hall EM, Flores SR, De Jesús VR. Influence of hematocrit and total-spot volume on performance characteristics of dried blood spots for newborn screening. Int J Neonatal Screen. 2015 Sep 1;1(2):69–78. doi:10.3390/ijns1020069

75. Aydoğdu M, Ertaş H, Ertaş FN, Akgür SA. Liquid–liquid extraction solvent selection for comparing illegal drugs in whole blood and dried blood spot with LC–MS-MS. J Anal Toxicol. 2025 Jan 1;49(1):26–35. doi:10.1093/jat/bkae081 PubMed PMID: 39366924.

76. Coskun O. Separation Tecniques: CHROMATOGRAPHY. North Clin Istanb. 2016. doi:10.14744/nci.2016.32757 PubMed PMID: 28058406.

77. Carr PW, Stoll DR, Wang X. Perspectives on recent advances in the speed of high-performance liquid chromatography. Analytical Chemistry. 2011. p. 1890–900. doi:10.1021/ac102570t PubMed PMID: 21341777.

78. Carvalho D, Pinho C, Oliveira R, Moreira F, Oliveira AI. Chromatographic Methods Developed for the Quantification of Quercetin Extracted from Natural

Sources: Systematic Review of Published Studies from 2018 to 2022. Molecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023. doi:10.3390/molecules28237714 PubMed PMID: 38067447.

79. Johnson D, Boyes B, Orlando R. The use of ammonium formate as a mobile-phase modifier for LC-MS/MS analysis of tryptic digests. Journal of Biomolecular Techniques. 2013 Dec;24(4):187–97. doi:10.7171/jbt.13-2404-005 PubMed PMID: 24294112.

80. Hanai T. Fundamental properties of packing materials for liquid chromatography. Separations. MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2019. doi:10.3390/separations6010002

81. Pesek JJ, Matyska MT. Silica hydride: A separation material every analyst should know about. Molecules. MDPI; 2021. doi:10.3390/molecules26247505 PubMed PMID: 34946587.

82. Ovbude ST, Sharmeen S, Kyei I, Olupathage H, Jones J, Bell RJ, et al. Applications of chromatographic methods in metabolomics: A review. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. Elsevier B.V.; 2024. doi:10.1016/j.jchromb.2024.124124 PubMed PMID: 38640794.

83. Phenomenex. Phenomenex [Internet]. [cited 2026 Aug 21]. Kinetex Core-Shell Biphenyl HPLC Columns. Available from: https://www.phenomenex.com/products/kinetex-hplc-column/kinetex-biphenyl

84. Bhati C, Minocha N, Purohit D, Kumar S, Makhija M, Saini S, et al. High Performance Liquid Chromatography: Recent Patents and Advancement. Biomedical and Pharmacology Journal. 2022;15(2):729–46. doi:10.13005/bpj/2411

85. Steckel A, Papp D, Schlosser G. Understanding Mass Spectrometry: From Ion Generation to Spectral Interpretation. Journal of Mass Spectrometry. 2026 Aug 1;61(8). doi:10.1002/jms.70078

86. Raffaelli A, Saba A. Ion scanning or ion trapping: Why not both? Mass Spectrometry Reviews. John Wiley and Sons Inc; 2023. p. 1152–73. doi:10.1002/mas.21746 PubMed PMID: 34726287.

87. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH [Internet]. [cited 2026 Sep 6]. ICH Official Website. Available from: https://www.ich.org/